

Renata Bannitz Fernandes

Caracterização bioquímica e estrutural de
peroxirredoxinas de *Aspergillus fumigatus*,
fungo patógeno oportunista humano

Biochemical and structural characterization of
peroxiredoxins from *Aspergillus fumigatus*,
human opportunistic pathogen

São Paulo

2018

Renata Bannitz Fernandes

Caracterização bioquímica e estrutural de
peroxirredoxinas de *Aspergillus fumigatus*,
fungo patógeno oportunista humano

Biochemical and structural characterization of
peroxiredoxins from *Aspergillus fumigatus*,
human opportunistic pathogen

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São
Paulo, para a obtenção de Título de
Doutor em Ciências, na Área de
Biologia/ Genética.
Orientador: Prof. Dr. Luis Eduardo
Soares Netto

São Paulo

2018

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca do Instituto de Biociências da USP,
com os dados fornecidos pelo autor no formulário:
<http://www.ib.usp.br/biblioteca/ficha-catalografica/ficha.php>

Bannitz-Fernandes, Renata
Caracterização bioquímica e estrutural de
peroxirredoxinas de *Aspergillus fumigatus*, fungo patógeno
oportunista humano / Renata Bannitz-Fernandes;
orientador Luis Eduardo Soares Netto. -- São Paulo, 2018.

118 f. + anexo

Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo, Departamento de Genética e
Biologia Evolutiva.

1. Peroxirredoxina. 2. *Aspergillus fumigatus*. 3. 1
Cys Prx. 4. Prx6. I. Netto, Luis Eduardo Soares, orient.
II. Título.

Bibliotecária responsável pela estrutura da catalogação da publicação:
Elisabete da Cruz Neves - CRB - 8/6228

Comissão Julgadora

Prof (a). Dr (a).

Prof. Dr. Luis Eduardo Soares Netto
Orientador

Dedicatória

À minha família, em especial aos meus sobrinhos Nicolas, Suria, Pietro e Luna, que nasceram junto com os experimentos mais importantes.

Epígrafe

“One child, one teacher, one pen and one book can change the world.”

Malala Yousafzai

Agradecimentos

À Universidade de São Paulo, especialmente aos Instituto de Biociências e Instituto de Química por toda a estrutura oferecida.

Às agências de fomento FAPESP, Capes e CNPq pelo apoio financeiro durante todo o projeto.

À todo CEPID Redoxoma, especialmente à Prof. Dra. Ohara Augusto por coordenar todo o projeto e ser uma grande inspiração.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luis Eduardo Soares Netto por ter aberto as portas do seu laboratório e por todo o conhecimento compartilhado.

Ao Prof. Dr. Marcos Antonio de Oliveira e seu laboratório, que sempre me recebe tão bem e me ajuda com tantas questões (desde 2009).

Ao Prof. Dr. Iran Malavazi e seu laboratório na UFSCar, em especial à Ms. Krissia Godoy e Dra. Marina Rocha, por todo aprendizado e por me apresentarem ao *Aspergillus fumigatus*.

Ao Prof. Dr. Aron B. Fisher e todo o seu laboratório da Upenn (Dr. Chandra Dodia, Dr. Jose Vazquez-Medina, Pryal Patel, Dra. Elena Sorokina, Dra. Shampa Chatterjee, Dr Sheldon Feinstein e Dra. Tao) por terem me recebido tão bem durante meu primeiro estágio no exterior.

A todo Laboratorio de Fisicoquímica Biológida da Udelar: aos amigos Mara Carreño, Martina Steglich, Luciana Fleitas, Jimena Hochmann, Dayana Benchoam, Florencia Orrico, Lucía Turell, Vera Skafar, Ana Clara Lopez, Sebastián Villar, Joaquín Dalla, Ernesto Cuevasanta, Bruno Musetti, Mariana Bonilla e aos professores Dra. Beatriz Alvarez, Dra. Ana Denicola, Dra. Leonor Thomson, Dr. Matías Möller e, especialmente, Dr. Gerardo Ferrer-Sueta. Gracias por me mostrarem um jeito mais divertido e proveitoso de trabalhar.

Aos amigos tão diversos que o Uruguai me deu, especialmente à Laura. Obrigada por ter sido minha família aí.

A todos os amigos do laboratório por todo companheirismo, troca de conhecimento e diversão: Sushi, Flávio, Renato, Helena, Fernando, Thiago, Simone, Julia, Amanda, Rogério, Carol, João, Carlos, César, Juliana, Dérik, Diogo, Anita, Andressa, Cris (*in memoriam*), Jana, Erina, Verônica, Vanessa, Angélica.

Aos outros colegas do IB: Vânia, Tati, Paulo, Mara.

Às amigas Houston e Jé pelos cafezinhos e jantares pra quebrar a rotina.

Às amigas Camila e Carol, que mesmo longe estamos perto.

Às amigas sempre presentes desde os tempos de bixetes: Dime, Hima, Barna, Cumpadi e Tama.

À minha nova família Angélica, Geovani e Thamara por abrirem os braços para mim e os gatinhos num momento tão importante. Angie, obrigada por tudo! Não sei como teria feito sem você.

À minha família toda que sempre me apoiou nos momentos mais difíceis do doutorado e por me entenderem nos momentos que não pude estar presente.

Mãe, Rada, Dé, Sil, Suria, Luna, Manu, Giu, Nicolas, Pietro, Thi, vó Rachel, vó Sebastina, Leda, Gi, Cé, Leila, Ti, Frida, Tatá, Linus.

Pai, Sil, Lu, vó Dorival, vó Magnólia.

Resumo

Peroxirredoxinas (Prxs) são peroxidases muito eficientes que dependem de uma tríade catalítica composta por uma Thr (ou Ser em alguns casos), uma Cys e uma Arg para decompor peróxidos. Elas podem ser classificadas em 1-Cys Prx e 2-Cys Prx, de acordo com o número de Cys envolvidas na catálise, ou de acordo com características estruturais que dividem as Prxs em 6 subfamílias. A grande maioria das enzimas da subfamília Prx6 é composta por 1-Cys Prx. As Prx6 são ainda pouco caracterizadas e a identidade biológica de seu (s) redutor (es) ainda é controversa. Alguns dos redutores candidatos são a Trx e o ascorbato. As Prx6 de mamíferos também possuem atividade de fosfolipase do tipo A₂ (PLA₂), que depende de uma tríade catalítica composta por uma His, uma Ser e um Asp. Nessa tese, investigamos aspectos bioquímicos e estruturais de duas enzimas da subfamília Prx6 de *Aspergillus fumigatus*: a AfPrx1 citossólica e a AfPrxC mitocondrial. *A. fumigatus* é o mais importante fungo patogênico transmitido pelo ar. Inicialmente, caracterizamos as cinéticas de oxidação de AfPrx1 e AfPrxC por H₂O₂, *t*-BOOH, CuOOH, LAOOH e ONOO⁻, monitorando alterações redox-dependentes das fluorescência intrínseca dessas proteínas. Adicionalmente, avaliamos as reduções de AfPrx1 e AfPrxC por Trx, Grx, ascorbato, ergotioneína, GSH e H₂S. Apenas H₂S reduziu eficientemente AfPrx1 e AfPrxC ($k_{AfPrx1} \approx 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ e $k_{AfPrxC} \approx 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Além da atividade peroxidásica, utilizamos lipossomos radioativos para caracterizar pela primeira vez atividade fosfolipásica (PLA₂) para uma Prx de não-mamífero que AfPrx1 e AfPrxC possuem. Esta atividade ($\approx 200 \text{ nmol/ h/ mg}$ de proteína) pode ser inibida por MJ33 (aproximadamente 75 %) e aumentada pela fosforilação através de MAPK. Adicionalmente, estas proteínas estão envolvidas na sobrevivência do fungo durante interação com macrófagos. Utilizando microeletrodo, pudemos verificar que AfPrx1 é importante para detoxificar o fungo de H₂O₂ exógeno. A caracterização bioquímica destas atividades catalíticas das Prxs pode abrir novas perspectivas para tratamentos, já que pelo menos AfPrx1 está envolvida na virulência de *A. fumigatus* em ensaios com camundongos.

Abstract

Peroxiredoxins (Prxs) are highly efficient peroxidases that depend on a catalytic triad composed of Thr/Ser, Cys and Arg residues. These enzymes can be classified as 2-Cys Prx and 1-Cys Prx, according to the number of Cys residues involved in catalysis or according to structural characteristics that divide the Prxs in 6 subfamilies. The Prx6 subfamily is almost exclusively composed by 1-Cys Prx enzymes. This subfamily is still poorly characterized and the identities of their biological reductants are still controversial. Some of the reductant candidates are thioredoxin (Trx) and ascorbate. The mammalian members of this subfamily possess an additional phospholipase A₂ (PLA₂) activity that relies on another catalytic triad that is composed by His, Ser and Asp residues. In this thesis, we investigated biochemical and structural aspects of two enzymes belonging to the Prx6 subfamily from *Aspergillus fumigatus*: the cytosolic AfPrx1 and the mitochondrial AfPrxC. *A. fumigatus* is the most important pathogenic fungus transmitted through the air. Initially, we characterized the oxidation of AfPrx1 and AfPrxC by H₂O₂, *t*-BOOH, CuOOH, LAOOH and ONOO⁻, monitoring redox dependent changes in the intrinsic fluorescence of these enzymes. Additionally, we characterized the reduction of AfPrx1 and AfPrxC by Trx, Grx, ascorbate, ergothioneine, GSH and H₂S. Interestingly, only H₂S reduced these proteins efficiently ($k_{AfPrx1} \approx 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ and $k_{AfPrxC} \approx 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). In addition to the peroxidase activity, we determined for the first time the phospholipase activity (PLA₂) for a non-mammalian Prx, using liposomes radioactive-labeled. AfPrx1 and AfPrxC displayed PLA₂ activity ($\approx 200 \text{ nmol/ h/ mg}$ of protein) that was inhibited by MJ33 (about 75 %) and enhanced after phosphorylation by MAPK. Moreover, we also showed that these proteins were important for fungus survival during studies co-cultures with macrophages. Furthermore, AfPrx1 was important to detoxify *A. fumigatus* from exogenous added H₂O₂ as observed through an electrochemical approach. The biochemical and structural characterization of these Prxs described herein can open new therapeutic strategies, since at least AfPrx1 is involved in fungus virulence in a mouse model.

Sumário

Introdução	11
Peroxirredoxinas e seu ciclo redox.....	11
Envolvimento de Peroxirredoxinas na sobrevivência, virulência e patogenicidade de organismos patogênicos.....	15
<i>Aspergillus fumigatus</i>: o mais importante fungo patogênico transmitido pelo ar	18
Objetivos	20
Objetivo Geral.....	20
Parte I – Caracterização inicial e avaliação da importância da atividade peroxidásica das Prx6 de <i>A. fumigatus</i>	21
Materiais e Métodos	21
Busca por peroxirredoxinas da subfamília Prx6 em <i>A. fumigatus</i>	21
Análises <i>in silico</i> para predição da localização sub-cellular de AfPrx1, AfPrxB e AfPrxC	21
Análises <i>in silico</i> para determinação da identidade da isoforma biológica de AfAfPrxB	22
Predição da estrutura terciária e quaternária de AfPrx1 e AfPrxC.....	22
Genes <i>Afprx1</i> , <i>AfprxB</i> e <i>AfprxC</i> otimizados.....	22
Expressão e purificação em <i>E. coli</i> de proteínas recombinantes.....	22
Quantificação de proteínas.....	23
Caracterização da estrutura quaternária de AfPrx1 e AfPrxC	24
Determinação da constante de segunda ordem por cinética competitiva	24
Avaliação da atividade peroxidásica de AfPrx1 e AfPrxC frente diferentes peróxidos ..	25
Medidas eletroquímicas <i>in vivo</i> para estudo da degradação de H ₂ O ₂ por AfPrx1	28
Avaliação da sobrevivência de <i>A. fumigatus</i> após estresse oxidativo e inserção do eletrodo.....	31
Avaliação da virulência das diferentes linhagens de <i>A. fumigatus</i> em macrófagos (J774)	31
Resultados e Discussão	34
Busca por Prx6 em <i>A. fumigatus</i>	34
Análises <i>in silico</i> de AfPrx1, AfPrxB e AfPrxC de <i>A. fumigatus</i>	35
Clonagem, expressão e purificação de Prx6 de <i>A. fumigatus</i>	38
Caracterização da estrutura quaternária de AfPrx1 e AfPrxC	42
Avaliação da atividade peroxidásica com H ₂ O ₂	44
Avaliação da atividade peroxidásica de AfPrx1 e AfPrxC frente diferentes hidroperóxidos	45
Medidas eletroquímicas <i>in vivo</i> para estudo da degradação de H ₂ O ₂ por AfPrx1	57
Avaliação da sobrevivência de <i>A. fumigatus</i> após estresse oxidativo e inserção do eletrodo.....	61
Avaliação da virulência das diferentes linhagens de <i>A. fumigatus</i> em macrófagos (J774)	62
Parte II – Identificação e caracterização de agentes redutores das Prx6 de <i>A. fumigatus</i>	65
Materiais e Métodos	65
Sistema Trx	65
Sistema Grx	70
Ascorbato.....	72
Experimentos de redução utilizando Ergotioneína, GSH ou H ₂ S.....	74
Resultados e Discussão	77
Avaliação do sistema Trx como possível redutor de AfPrx1 e AfPrxC	77
Avaliação do sistema Grx como possível redutor de AfPrx1 e AfPrxC	80
Avaliação de ascorbato como redutor de AfPrx1 e AfPrxC.....	83

Avaliação de ergotioneína como molécula redutora de AfPrx1 e AfPrxC	87
Glutationa como molécula redutora de AfPrx1 e AfPrxC	88
H ₂ S como molécula redutora de AfPrx1 e AfPrxC	88
Avaliação dos possíveis redutores de AfPrx1 e AfPrxC de <i>A. fumigatus</i>	90
Parte III – Caracterização da atividade de PLA₂ das Prx6 de <i>A. fumigatus</i>	92
Materiais e Métodos	92
Análise estrutural de AfPrx1 e AfPrxC.....	92
Avaliação da atividade de PLA ₂	92
Resultados e Discussão	97
Avaliação da atividade de PLA ₂ de AfPrx1 e AfPrxC	97
Interferência do inibidor MJ33 na atividade de PLA ₂ de AfPrx1 e AfPrxC	99
Interferência da fosforilação de AfPrx1 e AfPrxC na atividade de PLA ₂	100
Conclusões	104
Referências	106
Anexos	118

Introdução

Peroxirredoxinas e seu ciclo redox

As peroxirredoxinas (Prxs) são enzimas antioxidantes altamente conservadas, de grande representação entre os organismos e presentes em todos os reinos ^{1,2}. As Prxs estão envolvidas no processo de redução de hidroperóxidos no ambiente intracelular, portanto, possuem um importante papel na desintoxicação e no controle da concentração de hidroperóxidos ³⁻⁵. As Prxs também reduzem o peroxinitrito; sendo que AhpC de *Salmonella typhimurium* foi a primeira Prx descrita com a capacidade de reduzir o peroxinitrito em nitrito, em velocidade rápida o suficiente para evitar danos nos componentes celulares ⁶. Além disso, as Prx estão implicadas em muitos processos diferentes como sinalização celular, proliferação, diferenciação, citotoxicidade de *natural killer*, apoptose e permeabilidade da mitocôndria ^{4,7-9}.

As Prxs podem ser classificadas de acordo com o número de cisteínas envolvidas na catálise como 1-Cys Prx ou 2-Cys Prx, sendo que as 2-Cys Prx podem ser subdivididas em duas classes baseadas na formação intermolecular ou intramolecular do dissulfeto (2-Cys Prx típica e atípica, respectivamente) ¹⁰. Outra forma de classificação proposta envolve a conservação da sequência dos aminoácidos e/ ou características estruturais ^{11,12}. Recentemente foi criado uma base de dados (PREX - PeroxiRedoxin classification indEX) com 6325 sequências de Prxs subdivididas em seis subfamílias (AhpCPrx1, Prx6, Prx5, Tpx, BCP/PrxQ e AhpE). Os membros destas subfamílias foram identificados a partir de ferramenta de bioinformática que analisa sequências funcionalmente relevantes para a atividade da proteína, além de identificar semelhanças e diferenças entre: interface de oligomerização, sensibilidade redox, especificidade para doador de elétrons, sensibilidade de inativação com diferentes níveis de peróxido e especificidade de substrato (tipo de peróxido) ¹³.

Em todas as Prxs, a redução dos peróxidos começa pelo ataque nucleofílico do tiolato (RS^-) da cisteína peroxidásica (CysP) a um dos oxigênios do peróxido. Assim, a ligação O-O do peróxido é clivada heteroliticamente, com consequente formação de ácido sulfênico no resíduo CysP (CysP-SOH) e liberação de H_2O , no caso do H_2O_2 , ou de um derivado alcoólico no caso de peróxidos de lipídeos ¹⁴. O destino do ácido sulfênico (CysP-SOH) determina se a enzima é um 1-Cys Prx ou 2-Cys Prx. As 1-Cys

Prx possuem somente uma cisteína catalítica (a Cys_P) e sua forma oxidata (Cys_{P-SOH}) deve ser reduzida a fim de completar seu ciclo redox. Entretanto, para esta classe de proteínas (1-Cys Prx), esta etapa de redução não é bem estabelecida e seus agentes redutores na maioria das vezes são desconhecidos. Para algumas 1-Cys Prx, já foram descritos possíveis redutores, desde moléculas, como ascorbato; até sistemas redutores mais complexos como: sistema glutarredoxina (glutarredoxina (Grx), glutationa (GSH) e glutationa redutase (GR)); glutationa-S-transferase π (π GST) e glutationa (GSH); e sistema tiorredoxina (tiorredoxina (Trx), tiorredoxina redutase (TrxR) e NADPH)¹⁵⁻²⁰. Adicionalmente, foi recentemente descrito que GSH pode atuar como tiól de resolução que, além de evitar a superoxidação de ScPrx1, favorece a redução por Trx3 sem o consumo de GSH²¹ (Figura 1 C e Figura 2).

Em contraste, nas 2-Cys Prx o ácido sulfênico sofre reação de condensação com uma segunda cisteína, denominada de cisteína de resolução (Cys_R), liberando H₂O e formando uma ligação dissulfeto (Figura 1 A e B). Diversos trabalhos demonstram que para a formação do dissulfeto, há a necessidade de um rearranjo estrutural da Prx para que haja a aproximação das duas cisteínas^{14,22}. A ciclagem das 2-Cys Prx oxidadas envolve redução efetuada pela Trx. Por sua vez, a Trx oxidada é reduzida pela TrxR, que utiliza elétrons oriundos do NADPH^{1,5}.

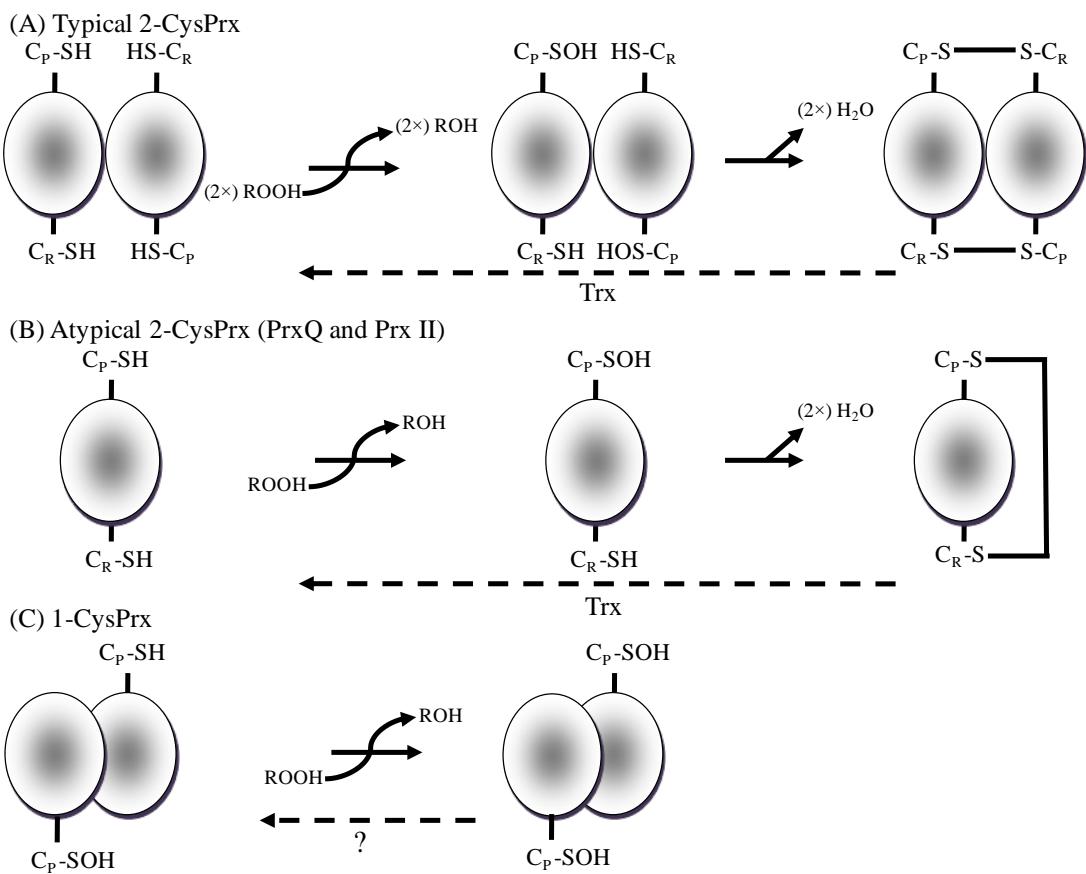


Figura 1 – Mecanismo catalítico de três tipos de Prxs. A cisteína peroxidásica (C_P) primeiramente reage com o peróxido. Na 2-Cys Prx típica, C_P-OH reage com a cisteína de resolução (C_R) presente na segunda unidade do dímero (A), enquanto que na 2-Cys Prx atípica a C_R está localizada na mesma cadeia polipeptídica (B). O ácido sulfênico derivado da 1-Cys Prx é diretamente regenerado por um doador de elétrons para a forma tiol (C). Abreviações: ROOH: peróxido; Trx: tiorredoxina (adaptado ¹⁰).

As reações de Prxs com peróxidos apresentam constantes de segunda ordem que variam entre $10^6 - 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, o que representa uma extraordinária eficiência catalítica, já que a cisteína livre possui uma constante de segunda ordem de aproximadamente $10 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ²³. Ou seja, nas mesmas condições, as Prxs podem reagir $10.000.000 \times$ mais rápido que uma Cys livre. Todas as Prxs caracterizadas até o momento possuem uma tríade catalítica (Cys_P, Thr/ Ser, Arg), sendo que os resíduos de Cys_P e a Thr/ Ser fazem parte do motivo universal das Prx (PxxxT/SxxC_P). Estes resíduos auxiliam na manutenção do ambiente favorável do sítio ativo ao, por exemplo, direcionar o peróxido e manter a Cys_P na forma de tiolato (Cys_P-S⁻)^{1,14,24,25}.

A unidade catalítica da grande maioria das Prxs é dimérica e podem se associar em tetrâmeros, hexâmeros e decâmeros^{10,14,26}. Entre os fatores que interferem no estado oligomérico, pode-se citar pH, força iônica, concentração e

estado redox²⁷⁻³⁰. Entretanto, quando algumas 2-Cys Prx típicas são expostas a altas concentrações de peróxido, a C_P pode ser superoxidada, assumindo a forma de cisteína ácido sulfínico (C_P-SO₂H) ou cisteína ácido sulfônico (C_P-SO₃H), após o ataque da cisteína ácido sulfênico (C_P-SOH) por outras moléculas de peróxido. Estas enzimas superoxidadas podem se polimerizam e formar oligômeros de maior massa molecular, muitos dos quais apresentam uma segunda atividade além da peroxidásica: de chaperona molecular; e podem ter função de sinalizador celular^{4,31}. Nas 2-Cys Prx pode ocorrer a redução do ácido sulfínico, em um processo lento e dependente de ATP e catalisado pela enzima sulfirredoxina (Srx)^{32,33}.

Quando uma enzima possui mais de uma atividade bioquímica, mas não como um produto de fusões gênicas, muitas vezes é denominada de *moonlight protein*³⁴. Neste contexto, adicionalmente às 2-Cys Prx típicas que exibem atividade peroxidásica e de chaperona molecular, algumas 1-Cys Prx possuem além da atividade peroxidásica a atividade de fosfolipase A₂ (PLA₂), sendo capazes de hidrolisar fosfolipídeos. Em mamíferos, estão fortemente relacionadas com a manutenção da homesotase do surfactante e decomposição de fosfatidilcolina internalizada de células pulmonares. Em fungos patógenos, enzimas PLA₂ liberadas durante a infecção de hospedeiros mamíferos podem desempenhar importantes papéis na aquisição de nutrientes pelo fungo, na invasão tecidual e na modulação da resposta imune do hospedeiro. As Prx6 de mamíferos que possuem atividade de PLA₂ utilizam a tríade catalítica S³², H²⁶ e D¹⁴⁰ para hidrolisar o fosfolipídeo³⁵⁻³⁸.

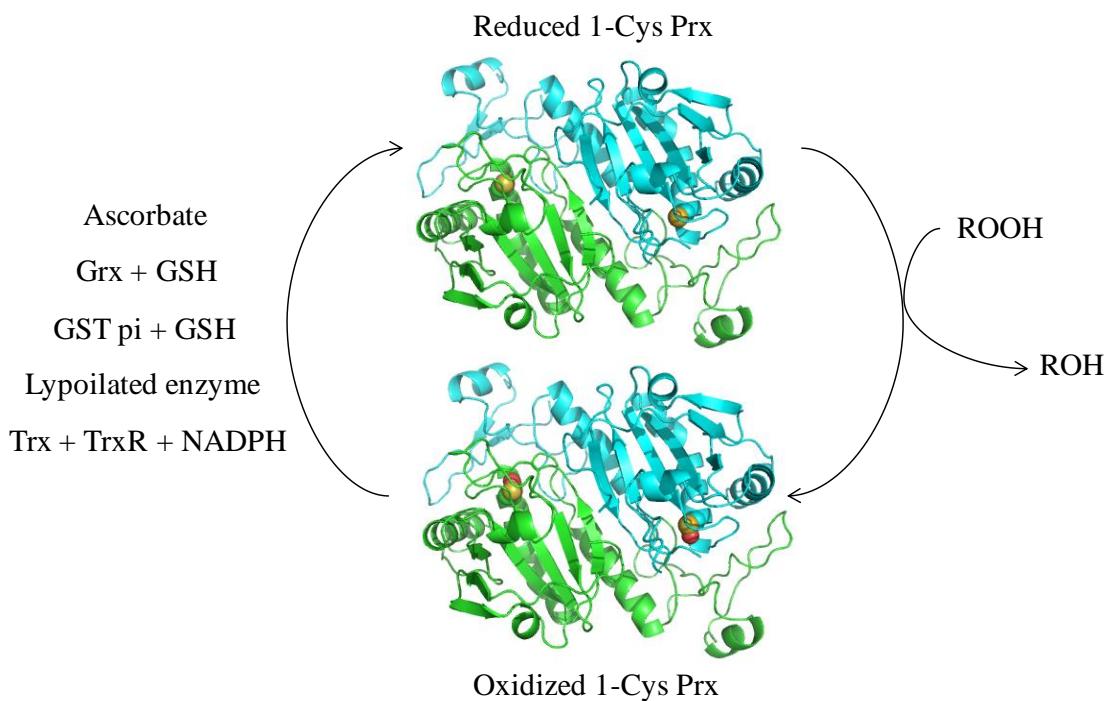


Figura 2 – Possíveis agentes redutores de 1-Cys Prx. A unidade catalítica da grande maioria das peroxirredoxinas 1-Cys é dimérica, cada monômero possui uma cisteína envolvida na catalise e estão representados em verde e azul. De maneira geral, as Prxs decompõem moléculas de peróxido, ficando oxidadas (Cys-SOH). Desta forma, precisam ser reduzidas para ficarem novamente ativas (Cys-SH). Esta etapa da redução não é clara para as 1-Cys Prx e alguns dos agentes redutores já descritos que possivelmente estão envolvidos nesta etapa são o ascorbato; a glutaredoxina (Grx) com glutationa (GSH), a glutationa-S-transferase (π GST) com GSH; enzimas lipoiladas e o sistema Trx (tiorredoxina, tiorredoxina redutase e NADPH). A peroxirredoxina ilustrada em *cartoon* é a Prx6 de *Homo sapiens* (PDB code: 1PRX). O átomo de enxofre está destacado em amarelo e o átomo de oxigênio em vermelho. Imagem gerada através do programa Pymol.

Envolvimento de Peroxirredoxinas na sobrevivência, virulência e patogenicidade de organismos patogênicos

Diversos estudos demonstram que, durante infecções, um dos mecanismos mais importantes para a defesa do hospedeiro é o *burst* oxidativo. O *burst* oxidativo é a geração de diversas moléculas oxidantes (H_2O_2 , O_2^- , HOCl) no fagossomo de células fagocitárias, como macrófagos e neutrófilos, a fim de eliminar o patógeno do organismo (Figura 3)³⁹⁻⁴¹.

Como mencionado anteriormente, as Prxs são capazes de detoxificar peróxidos com alta eficiência e acredita-se que teriam um papel importante na resposta de patógenos (como bactérias, fungos e tripanossomatídeos) ao estresse oxidativo gerado pelo hospedeiro. Além de sua alta reatividade e abundância, muitos

destes microorganismos não possuem catalases e/ou glutationa peroxidases selênio dependentes (GPx). Em princípio, a depleção dos níveis de antioxidantes de patógenos os tornaria mais susceptíveis ao estresse oxidativo gerado pelo hospedeiro. Sendo assim, é importante a caracterização destas proteínas e seus papéis na prevenção de danos oxidativos aos patógenos⁴²⁻⁴⁵.

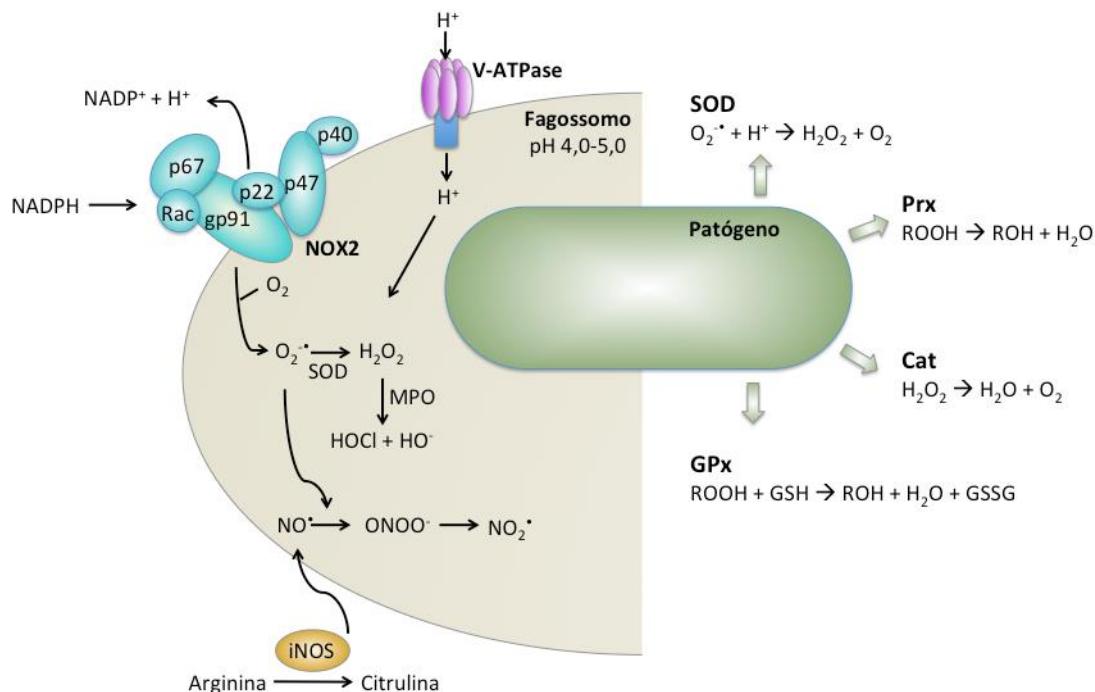


Figura 3 – *Burst* oxidativo produzido em fagossomo de células fagocitárias do hospedeiro versus os principais mecanismos de defesa antioxidante proteico do patógeno. No hospedeiro: NADPH oxidase 2 (NOX2) é um complexo proteico que, quando ativado, possui seis subunidades (p40phox, p67phox, Rac, p47phox, p22phox e gp91phox) e produz radical ânion superóxido (O_2^{\cdot}) através da redução do oxigênio molecular (O_2). O radical produzido pode sofrer dismutação espontânea ou catalisada pela Superóxido Dismutase (SOD) e formar peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A proteína Mieloperoxidase (MPO) pode ainda produzir ácido hipocloroso ($HOCl$) a partir do H_2O_2 e íon cloreto (Cl^-). Óxido nítrico sintase (iNOS) catalisa a produção de óxido nítrico (NO^{\cdot}) a partir de L-arginina. No patógeno: SOD catalisa a dismutação de O_2^{\cdot} em H_2O_2 . Peroxirredoxina (Prx) catalisa a redução de hidroperóxidos no álcool correspondente ou água, no caso de H_2O_2 . Catalase (Cat) catalisa a redução de H_2O_2 em H_2O . Glutationa peroxidase (GPx) catalisa a redução de hidroperóxidos no álcool correspondente ou água, no caso de H_2O_2 com auxílio de glutationa (GSH) (adaptado⁴⁶).

Em *Trypanosoma cruzi*, o agente causador da doença de Chagas, foi demonstrado que as Prx desempenham papel fundamental no desenvolvimento da doença, uma vez que parasitas que superexpressam Prx (c-TXNPx e m-TXNPx) apresentam um significante aumento na capacidade de infectar células fagocíticas e não fagocíticas⁴⁷.

Salmonella typhimurium (o agente causador de moléstias gastrointestinais, febre tifóide e septicemia) é um patógeno intracelular de macrófagos e, portanto, está sob intenso estresse oxidativo. Recentemente foi demonstrado que linhagens deficientes de Prx apresentam alteração da morfologia celular e proliferação reduzida no interior da célula. O estudo também revelou que quando uma Prx (TSAA) é superexpressa em células de *S. typhimurium* nocauteadas para genes envolvidos na decomposição de peróxidos ($\Delta KatE$, $\Delta KatG$, $\Delta KatN$, $\Delta AhpC$ e $\Delta TSAA$), o patógeno recupera as características da linhagem selvagem. Estes dados indicam que as Prx de *S. typhimurium* contribuem para a virulência do patógeno ao capacitá-lo a sobreviver em ambientes hostis⁴⁸. Adicionalmente, em *Mycobacterium tuberculosis*, o agente causador da tuberculose, foi demonstrado que em linhagens que apresentam deleção do gene que codifica a enzima catalase são virulentas e que a sobrevivência destas cepas no hospedeiro é atribuída às Prx⁴⁹.

Recentemente, uma Prx de *Aspergillus fumigatus* foi caracterizada pela primeira vez. Nomeada de Asp f3, a proteína é 2-Cys, dimérica e possui atividade peroxidásica com H₂O₂ e peróxido orgânico *t*-BOOH. O fungo knockout para o gene *asp f3* foi sensível a estresse oxidativo e significativamente menos virulento em modelo de aspergilose invasiva pulmonar (AIP) em camundongo⁵⁰.

Outro trabalho, agora envolvendo uma Prx 1-Cys, demonstra o envolvimento desta proteína (LsfA) na proteção contra H₂O₂ e na patogenicidade de *Pseudomonas aeruginosa*. Em modelo de pneumonia aguda, camundongos infectados com a bactéria knockout para o gene *lsfA* liberam mais citocinas nos pulmões, recrutam mais neutrófilos e possuem melhores taxas de sobrevivência se comparados ao wt⁵¹.

Em acordo com as observações acima, as tiól peroxidases são largamente encontradas e bastante abundantes em patógenos que infectam animais e plantas^{52,53}. Em alguns casos, estas proteínas apresentam aspectos estruturais únicos que as diferem largamente de enzimas correspondentes do hospedeiro e as colocam como alvos bastante promissores para o desenvolvimento de drogas específicas para o combate de determinados patógenos^{45,47,54,55}. De fato, cabe destacar aqui que vários antibióticos e adjuvantes (compostos que fazem a bactéria mais suscetível aos antibióticos) operam via geração de estresse oxidativo ao hospedeiro⁵⁶. Desta forma, a importância de enzimas antioxidantes, incluindo as Prx, para a manutenção do patógeno fica ainda mais evidente uma vez que sua depleção ou inibição pode resultar

na hipersensibilidade do patógeno frente à explosão oxidativa gerada naturalmente pelo hospedeiro ou através da administração de drogas⁵⁷.

Aspergillus fumigatus: o mais importante fungo patogênico transmitido pelo ar

Espécies do gênero *Aspergillus* são ubíquas, saprofíticas e possuem um papel importante no ciclo do carbono e nitrogênio. Apesar de desempenharem este papel ecológico importante, algumas espécies são patógenos oportunistas, que produzem conídios pequenos e hidrofóbicos que se dispersam facilmente no ar e sobrevivem em uma grande variedade de ambientes^{58,59}. *A. fumigatus* é um dos responsáveis mais frequentes por infecções fúngicas sistêmicas, sendo considerado o principal fungo patogênico transmitido pelo ar. As infecções são causadas pela inalação dos conídios, que atingem os pulmões do hospedeiro. Os conídios liberados na atmosfera possuem diâmetro pequeno o suficiente (2 a 3 µm) para atingir os alvéolos pulmonares^{60,61}. A população residente de macrófagos alveolares é a primeira linha de defesa imune a interagir com *A. fumigatus* no pulmão⁶². Os conídios que não forem eliminados pelos alvéolos pulmonares germinam, originando micélios. Estes são atacados pelos neutrófilos recrutados através da liberação de citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos alveolares. Tanto os macrófagos alveolares quanto os neutrófilos recrutados utilizam mecanismos oxidativos (como H₂O₂) como não-oxidativos (como proteases) para eliminar o fungo (Figura 4)^{63,64}.

Entretanto, indivíduos com deficiências no sistema imune, como neutropenia (diminuição no número de neutrófilos na corrente sanguínea), pacientes que recebem tratamento com corticosteroides, indivíduos com AIDS e pacientes com doença granulomatosa crônica hereditária, podem adquirir infecções com altas taxas de mortalidade. Os tipos de doenças causadas por este fungo em indivíduos imuno-competentes são reações alérgicas e colonização com invasão limitada, enquanto que em indivíduos imuno-comprometidos são infecções severas com altas taxas de mortalidade^{61,65}.

Os sintomas das infecções fúngicas invasivas são inespecíficos, tornando o diagnóstico baseado em diferentes técnicas como exame de tecidos, radiologia, cultivos microbiológicos bem como testes sorológicos e moleculares. Essas infecções são a principal causa de mortalidade em pacientes que foram submetidos a transplante

de medula óssea ou transplante de células-tronco⁵⁸. A Aspergilose Invasiva Pulmonar (AIP) é o principal exemplo de infecção de alto risco em indivíduos imunocomprometidos, podendo alcançar taxa de mortalidade de até 90%, pois geralmente é fatal se não for tratada rapidamente. Diagnósticos específicos são muito limitados e intervenções terapêuticas são ineficazes, o que agrava ainda mais o prognóstico dos pacientes⁶⁶. Embora as hospitalizações relacionadas à aspergilose representem uma pequena porcentagem das internações, os pacientes internados nesta condição têm hospitalização prolongada e altas chances de mortalidade, aumentando muito os custos envolvidos com esta doença⁶⁷.

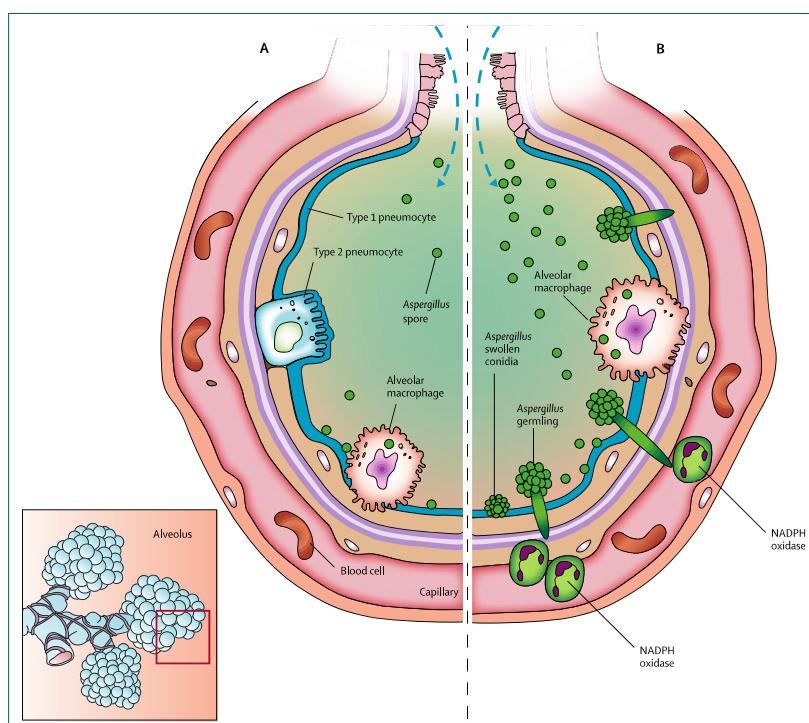


Figura 4 – Mecanismos de defesa dos indivíduos imunocompetentes. Após a inalação, macrófagos alveolares e o epitélio respiratório eliminam os conídios de *A. fumigatus*, a maioria dormente (A). Após exposição substancial (B), a grande carga fúngica supera essas defesas, permitindo que mais conídios em germinação sobrevivam. Em resposta às hifas germinantes, os neutrófilos são recrutados através de citocinas de macrófagos alveolares ou pneumocitos, ou ambos. Neutrófilos atacam hifas, inibindo seu crescimento (extraído⁶³).

Objetivos

Objetivo Geral

Caracterização funcional e estrutural das enzimas antioxidantes AfPrx1 e AfPrxC do fungo patógeno humano *A. fumigatus*.

Metas

- Busca por peroxirredoxinas da subfamília 6 em *A. fumigatus*.
- Clonagem, expressão e purificação de AfPrx1 e AfPrxC;
- Determinação do estado oligomérico;
- Determinação da atividade peroxidásica (H_2O_2 ; *t*-BOOH; CuOOH; LAOOH; $ONOO^-$);
- Verificar a importância de AfPrx1 e AfPrxC na detoxificação do fungo;
- Avaliação do possível redutor biológico destas enzimas (sistema Trx; sistema Grx; ascorbato; ergotioneína; GSH; H_2S);
- Avaliação da atividade de PLA₂.

Parte I – Caracterização inicial e avaliação da importância da atividade peroxidásica das Prx6 de *A. fumigatus*

Materiais e Métodos

Busca por peroxirredoxinas da subfamília Prx6 em *A. fumigatus*

A busca das sequências foram feitas através dos softwares BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), Fungal Peroxidase Database (fPoxDB) (<http://peroxidase.riceblast.snu.ac.kr/index.php?a=view>)⁶⁸ e PeroxiRedoxin classification IndeX (PREX) (<http://csb.wfu.edu/prex/>)¹³.

Análises *in silico* para predição da localização sub-celular de AfPrx1, AfPrxB e AfPrxC

As primeiras análises de predição de localização sub-celular das peroxirredoxinas utilizadas neste trabalho foram realizadas através do software WoLF PSORT⁶⁹. Este software é uma extensão do famoso PSORT II e utiliza também algumas características do PSORT e do iPSORT. É possível escolher entre os reinos *fungi*, *plant* e *animal* para realizar a pesquisa. Este software necessita apenas do *input* da sequência primária da proteína de interesse para realizar a predição, utilizando comparações com extensa base de dados de proteínas com localização subcelular conhecida.

Adicionalmente, foi utilizado o software MitoFates para predizer a região N-terminal de endereçamento mitocondrial bem como seu sítio de clivagem⁷⁰. As características que este software analisa incluem: regiões anfipáticas carregadas positivamente; motivos pré-sequência; sítios de clivagem de pré-sequência para determinadas enzimas (MPP, Icp55, Oct1); composição físico-química de aminoácidos. Os resultados obtidos pelo software relacionados com os sítios de clivagem foram analisados utilizando a base de dados de peptídades MEROPS⁷¹.

O possível endereçamento para o lisossomo (compartimento de algumas peroxirredoxinas da subfamília Prx6, já demonstrado para algumas Prx de mamíferos) foi avaliado segundo similaridade com o motivo de Prx6 de *Rattus norvegicus* determinado por Sorokina e colaboradores em 2009⁷².

Análises *in silico* para determinação da identidade da isoforma biológica de AfPrxB

As análises de bioinformática foram realizadas em colaboração com o então pós-doutorando de nosso laboratório, Jonas Weissmann Gaiarsa. Foram realizadas análises de mapeamento gênico a partir de experimentos de RNA-seq selecionados na base de dados SRA (*Sequence Read Archive*) do NCBI. Estas análises visaram determinar a isoforma da proteína AfPrxB que é encontrada naturalmente em *A. fumigatus* e também analisar se AfPrxB foi expressa diferencialmente nas diferentes condições experimentais. Os resultados foram obtidos através do software Bowtie (Johns Hopkins University) de alinhamento voltado para alinhar rapidamente grandes conjuntos de seqüências curtas de DNA (reads) com grandes genomas e do software Tuxedo, que permite estimar abundância, expressão diferencial e regulação em amostras de RNA-Seq.

Predição da estrutura terciária e quaternária de AfPrx1 e AfPrxC

A predição das estruturas terciária e quaternária das enzimas AfPrx1 e AfPrxC foi realizada através do software SWISS-MODEL⁷³. A visualização e análise, incluindo a análise de hidrofobicidade, foram realizadas no programa UCSF Chimera (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>).

Genes *Afprx1*, *AfPrxB* e *AfprxC* otimizados

Os genes *Afprx1*, *AfprxB* e *AfprxC* otimizados para expressão em *Escherichia coli* foram sintetizados pela empresa GenScript® visando expressão de alto rendimento na fração de proteínas solúveis da linhagem BL21(DE3). Todos os genes foram sintetizados com os sítios de restrição *NdeI* na região 5' e *BamHI* na região 3' para posterior clonagem em pET15b.

Expressão e purificação em *E. coli* de proteínas recombinantes

As diferentes linhagens de expressão utilizadas (BL21 (DE3); BL21 (DE3) C41; BL21 (DE3) C43; BL21 (DE3) Groel; Origami (DE3); BL21 (DE3) pLysS; BL21 (DE3) pLysE; Rosetta (DE3) e BL21 (DE3) CodonPlus RIPL) foram transformadas, crescidas e com expressão induzidas seguindo orientações do fabricante. Após a

indução, as células foram decantadas por meio de centrifugação 20 min/ 4 °C/ 5000 rpm e ressuspensas em tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4, NaCl 100 mM e imidazol 10 mM. O rompimento das células foi realizado por sonicação (35% amplitude, 5 minutos) e os ácidos nucléicos foram removidos por meio de tratamento com sulfato de streptomicina (concentração final = 1%) por 15 minutos. Após este período, o extrato foi centrifugado por 45 min/4 °C/ 15000 rpm, o precipitado descartado e os extratos proteicos livres de ácidos nucléicos coletados.

As proteínas que foram expressas em vetores que adicionam cauda de histidina foram purificadas por cromatografia de afinidade por metais (IMAC: *Immobilized Metal Affinity Chromatography*) em colunas HisTrap FF (GE Healthcare) ou Ni-NTA Superflow (Qiagen) em gradiente de Imidazol em AKTA (GE Healthcare). A qualidade da purificação das proteínas foi constatada por SDS-PAGE em condições redutoras. Após estes procedimentos, as proteínas foram dessalinizadas através de cromatografia de filtração em gel utilizando a coluna PD10 (GE Healthcare) e concentradas por centrifugação (5000 rpm/ 4 °C) utilizando concentradores Ultracel YM-30 (Millipore) até concentração final desejada.

Quantificação de proteínas

As proteínas purificadas foram quantificadas através do coeficiente de extinção obtido no site <http://www.expasy.org/tools/protparam> (Tabela 1).

Tabela 1 – Relação dos coeficientes de extinção das proteínas utilizadas neste trabalho. Os ϵ foram obtidos a partir do software Protparam.

Proteína	Coeficiente de extinção ($M^{-1} cm^{-1}$)	Peso molecular (Da)
AfPrx1 (Afu4g08580) com His-tag	21095 _{OXI} / 20970 _{RED}	25555,9
AfPrx1 (Afu4g08580) sem His-tag	21095 _{OXI} / 20970 _{RED}	23392,6
AfPrxC (Afu8g07130) com His-tag	22460 _{OXI} / 22460 _{RED}	31769,4
AfPrxC (Afu8g07130) sem His-tag	22460 _{OXI} / 22460 _{RED}	29606,1
AfPrxC sem pep. sinal (Afu8g07130) His-tag	22460 _{OXI} / 22460 _{RED}	26843,5
AfPrxC sem pep. sinal (Afu8g07130) His-tag	22460 _{OXI} / 22460 _{RED}	24680,2

Caracterização da estrutura quaternária de AfPrx1 e AfPrxC

Foram utilizadas três técnicas diferentes a fim de determinar os possíveis estados oligoméricos das proteínas AfPrx1 e AfPrxC.

Cromatografia de Exclusão Molecular (SEC)

As proteínas foram submetidas à Cromatografia de Exclusão Molecular (SEC) utilizando o equipamento HPLC (Shimadzu); a coluna utilizada foi Phenomenex Yarra SEC-3000 em fluxo 1 mL/ min e os padrões de peso molecular tioglobulina (670 kDa), gama tubulina bovina (158 kDa), ovalbumina (44 kDa), mioglobulina (17 kDa) e vitamina B₁₂ (1,35 kDa) (Gel Filtration Standard 151-1901 BioRad). Cada amostra foi medida sem tratamento, com tratamento oxidante (1,2 equivalente de H₂O₂) e redutor (20 equivalentes de DTT).

Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

As proteínas foram analisadas utilizando a técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS). As medidas foram realizadas no equipamento DynaPro NanoStar (Wyatt Technology). Cada amostra foi medida sem tratamento, com tratamento oxidante (1 equivalente de H₂O₂) e redutor (20 equivalentes de DTT).

Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo (SAXS)

As proteínas foram analisadas utilizando a técnica de Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo (SAXS), numa colaboração com o prof. Dr. Cristiano Oliveira e sua aluna Maximila Frazão de Souza (Instituto de Física – USP). As medidas de SAXS foram realizadas no Instituto de Física da USP utilizando o equipamento XEUS-Xenoes. Cada amostra foi submetida a medidas de 30 minutos, em um tempo total de 14 horas. Os programas utilizados para análises foram: GNOM⁷⁴, CRYSTAL⁷⁵ e Coral⁷⁶. Cada amostra foi medida sem tratamento, com tratamento oxidante (1 equivalente de H₂O₂) e redutor (20 equivalentes de DTT).

Determinação da constante de segunda ordem por cinética competitiva

Foram determinadas as constantes de segunda ordem da reação de H₂O₂ com as Prx de *A. fumigatus* (AfPrx1 e AfPrxC) a partir da competição com HRP (*Horseradish peroxidase* - peroxidase de raiz forte). HRP é uma heme-peroxidase que

contem um átomo de Fe³⁺ no seu centro catalítico. O espectro de absorção da proteína HRP em seu estado férrico (reduzido) apresenta um pico em 403 nm, enquanto o espectro correspondente ao seu estado oxidado (composto I), apresenta pico de menor intensidade neste comprimento de onda. Desta forma, o aumento da concentração de um competidor pelo substrato (no caso uma peroxiredoxina) diminui a porcentagem de HRP que se oxida. Portanto, quanto maior a concentração de Prx, maior a concentração de HRP-férrica, que tem seu pico de absorção a 403 nm⁷⁷.

Para os ensaios de cinética competitiva, as Prx foram tratadas previamente com DTT 20 mM *overnight*, e o excesso do agente redutor foi removido por dois procedimentos subsequentes de dessalinização através de cromatografia de filtração em gel utilizando a coluna PD10 (GE Healthcare). Posteriormente, Prx 20 µM e DTNB 1 mM foram adicionados em um tampão desnaturante (Uréia 8 M, DTPA 1 mM e Tris-Cl 30 mM, pH 7,0). Após 15 minutos de reação, mediu-se a absorbância a 412 nm para verificação da formação de TNB ($\epsilon_{TNB}=13600\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$) e cálculo da quantidade de cisteínas livres.

No ensaio de competição por H₂O₂ com HRP, a reação continha tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,4; DTPA 0,1 mM; HRP 8 µM e concentrações crescentes (0, 4, 8, 12 e 16 µM) de Prx (previamente reduzida com DTT e dessalinizada), e seus espectros de absorção foram medidos nos comprimentos de onda entre 300 e 700 nm a 37 °C. Na sequência, foi adicionado H₂O₂ 4 µM e, após 20 segundos, os espectros de absorção nos comprimentos de onda entre 300 e 700 nm foram medidos novamente. Como controle negativo foi utilizada reação sem a adição de Prx e como controle positivo foram efetuadas reações contendo concentrações crescentes (4-16 µM) de TSA1 de levedura, a qual a constante de segunda ordem foi previamente determinada ($k_{TSA1}=10^7\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$)⁷⁸.

Avaliação da atividade peroxidásica de AfPrx1 e AfPrxC frente diferentes peróxidos

Os experimentos realizados foram conduzidos sob supervisão do Prof. Dr. Gerardo Ferrer-Sueta, no Laboratorio de Fisicoquímica Biológica da Facultad de Ciencias (Universidad de la República – Udelar, Montevidéu, Uruguai). Os dados cinéticos foram obtidos a partir de espectros *time-resolved* das reações entre as Prx e os peróxidos através da fluorescência intrínseca proteica ($\lambda_{ex}=280\text{ nm}$). A abertura

do monocromador nestes experimentos foi de 2 mm. Os dados foram adquiridos com o espetrômetro *stopped-flow* SX20 (Applied Photophysics). Pelo menos 12 corridas por ponto foram adquiridas para todas as condições. As soluções utilizadas no *stopped-flow* devem ter o dobro da concentração desejada, uma vez que este equipamento mistura as soluções em partes iguais para iniciar as reações e as leituras.

Os peróxidos avaliados foram: peróxido de hidrogênio (H_2O_2); peróxido de *tert-butyl* (*t*-BOOH); peróxido de cumeno (CuOOH); peróxido de ácido linoleico (LAOOH) e peroxinitrito ($ONOO^-$) (Figura 5).

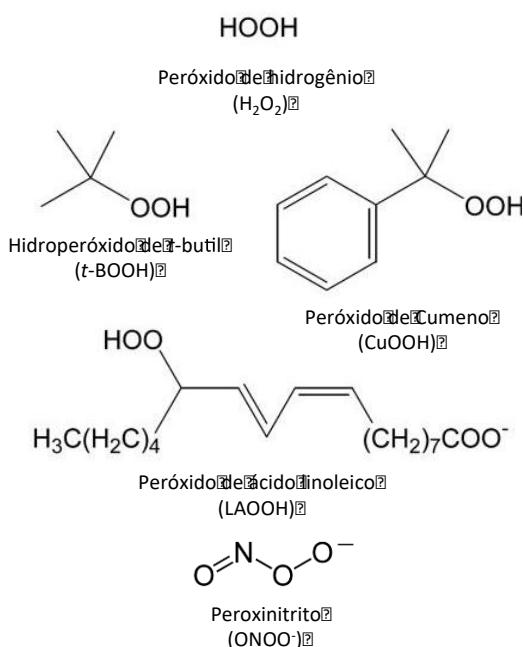


Figura 5 – Estruturas dos cinco peróxidos substratos para AfPrx1 e AfPrxC estudados neste trabalho.

Para todos os experimentos, as proteínas foram previamente tratadas com 20 mM de DTT por 3 horas *RT* ou *overnight* 4 °C. Posteriormente foram dessalinizadas em tampão 2 × (Tris 60 mM; MES 30 mM; ácido acético 30 mM; NaCl 240 mM; DTPA 0,1 mM pH 7,1) com auxílio de coluna PD10 (GE Healthcare). Para os experimentos com $ONOO^-$, as proteínas foram mantidas em tampão fosfato de sódio 100 mM pH 6,0 ($Na_2HPO_4 + HCl$) (não se deve utilizar NaOH para ajustar pH pois este vem com Na_2CO_3 contaminante, que gera CO_2 em meio aquoso, que por sua vez reage muito rápido com $ONOO^-$).

Os experimentos conduzidos com AfPrx1 possuíam 0,5 μM de proteína (concentração 1 μM na seringa, antes da mistura), e foram conduzidos em pH 6,0 aproximadamente. Para tanto, foi adicionado ácido acético nas soluções dos

peróxidos, antes da mistura com a proteína. Já os experimentos realizados com AfPrxC continham 1 μM final de proteína e foram conduzidos em pH 7,8 aproximadamente. Assim, foi adicionado NaOH nas soluções dos peróxidos, antes da mistura com a proteína. Estes valores específicos de pH para cada enzima foram fundamentais para que os cálculos das reações fossem possíveis. Todas as reações foram conduzidas a 25 °C.

Para determinação da constante de segunda ordem entre as Prx e H₂O₂, as concentrações finais de peróxido variaram entre 3 e 20 μM para a primeira fase da reação e entre 4 e 20 mM para a segunda fase da reação (superoxidação). H₂O₂ foi diluído em água e sua concentração calculada espectrofotometricamente ($\lambda = 240 \text{ nm}$; $\epsilon = 39,4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Para as reações com *t*-BOOH, as concentrações finais variaram de 3 e 20 μM para a primeira fase da reação e entre 4 e 22 mM para a segunda fase da reação. *t*-BOOH foi diluído em água. Com CuOOH, as concentrações finais variaram de 3 a 30 μM para a primeira fase da reação, o peróxido foi diluído em água. A segunda fase não foi avaliada devido a solubilidade desta molécula. Para LAOOH, as concentrações finais variaram entre 6 e 20 μM para a análise da primeira fase, o peróxido foi diluído em 1 % de etanol (0,5 % de etanol na reação). Devido a baixa solubilidade do LAOOH, não foi possível calcular a constante da segunda fase da reação. LAOOH foi sintetizado e quantificado pelo laboratório da Prof. Dra. Sayuri Miyamoto ⁷⁹.

Por fim, as concentrações de ONOO⁻ variaram entre 10 e 115 μM . Devido a alta reatividade do ONOO⁻ e de seus produtos, reações que passam depois de 0,5 s são muito complexas para analisarmos por essa técnica e por isso não foi possível calcular a superoxidação das proteínas por este peróxido. O ONOO⁻ foi sintetizado segundo Radi et al 1991 ⁸⁰. Antes do experimento: adicionar MnO₂ ao ONOO⁻ a fim de retirar o H₂O₂ contaminante no dia anterior, deixar a -20 °C até pouco antes do uso, descongelar, esperar que termine a formação de bolhas, centrifugar, coletar sobrenadante, quantificar ONOO⁻ ($\lambda = 302 \text{ nm}$; $\epsilon = 1670 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e diluí-lo em NaOH 5 mM a fim de desfavorecer a homólise (ONOOH \rightarrow ·OH + ·NO₂) ⁸¹.

As análises dos resultados e os cálculos foram realizados através do software Origin®. De maneira simplificada, os dados foram ajustados em equação para obtenção da constante observada (k_{obs}) da reação. A média e os desvios padrões dos

k_{obs} foram graficados contra as concentrações dos peróxidos correspondentes. A partir de ajuste linear foram obtidas as constantes de segunda ordem das reações.

Medidas eletroquímicas *in vivo* para estudo da degradação de H₂O₂ por AfPrx1

Todos os experimentos eletroquímicos foram realizados no Laboratório de Sensores Eletroquímicos e Métodos Eletroanalíticos (LSEME) do Prof. Dr. Mauro Bertotti sob total auxílio dos seus alunos Carla Santana Santos e Alex da Silva Lima (IQ – USP). Os resultados estão descritos em artigo publicado no periódico *Analytical Chemistry* (Anexo II)⁸².

Constituição e funcionamento do microeletrodo sensor de H₂O₂

O microeletrodo foi fabricado pelos alunos Carla Santana Santos e Alex da Silva Lima do Prof. Dr. Mauro Bertotti. Sua estrutura e funcionamento será descrita apenas para fim de favorecer o entendimento do método.

O microeletrodo possui um *core* de platina (eletrodo de trabalho), envolto por um capilar de vidro de borosilicato e coberto por uma camada de epoxi de prata (eletrodo pseudo-referência). Esta camada externa de prata garante a especificidade deste microeletrodo (Figura 6 A). O microeletrodo é conectado a um potenciómetro. Esse equipamento permite controlar o potencial aplicado nos eletrodos (referência e trabalho) e medir a corrente do processo. A corrente é um parâmetro quantitativo: quanto maior for a concentração de peróxido de hidrogênio em solução, maior será a quantidade de material reduzido e maior seu valor. Para reduzir o peróxido de hidrogênio, deve-se varrer o potencial para valores negativos, quando a reação de redução ocorre uma corrente negativa é monitorada (método de voltametria cíclica). A ponta do microeletrodo foi inserida no microambiente de um micélio com auxílio de um micromanipulator. Solução de peróxido foi adicionada ao meio mínimo (exógeno) enquanto se executava voltamogramas cíclicos para detectar a presença de H₂O₂ dentro do microambiente do micélio. No caso em que H₂O₂ estava presente, foi possível verificar um aumento na intensidade das correntes em potencial de -800 mV (Figura 6 B). De maneira simplificada, quanto mais negativa for a corrente no eixo y (maior intensidade) no valor de corrente -800 mV do eixo x, maior a concentração de H₂O₂ na amostra.

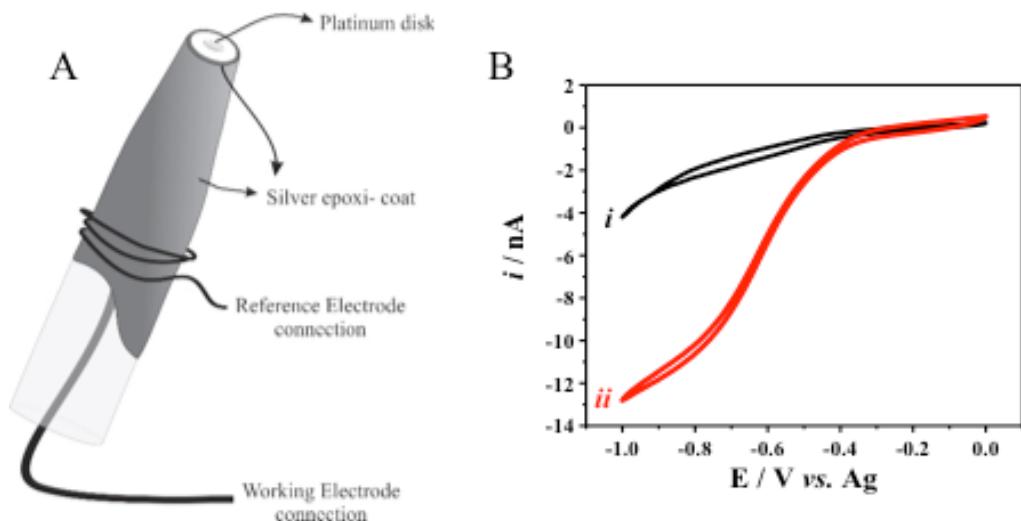


Figura 6 – Características do microeletrodo sensor de H_2O_2 . A) Estrutura física do microeletrodo: *core* de platina, envolto por um capilar de vidro de borosilicato e coberto por uma camada de epoxi de prata. B) Resultado da medida do microeletrodo em solução antes (i) ou depois (ii) da adição de 1 mM de H_2O_2 .

Preparação dos micélios de *A. fumigatus* para análise com microeletrodo

As linhagens utilizadas foram: wt, $\Delta AfprxI$ e $\Delta AfPrxI::\Delta AfPrxI^+$. Estas foram crescidas a partir da solução estoque (-80°C) em meio sólido YAG (extrato de levedura 0,5 %; glicose 2 %; elementos traços 1 mL/L) em estufa bacteriológica a 37°C por 72 h. Em fluxo laminar de classe II, cada placa foi raspada superficialmente com 15 mL de água Milli-Q estéril utilizando uma pipeta Pasteur estéril. A solução de esporos obtida foi filtrada com papel Miracloth (Merck Millipore 475855) e contada utilizando câmara de Neubauer. 1×10^6 conídeos foram inoculados em 50 mL de Meio Mínimo (MM) líquido (1 % de glicose (w/v), solução de sais 1 × e elementos traços 1 ×). A composição da solução de sais e dos elementos traços foi previamente descrita por Kafer, 1977⁸³. A cultura foi incubada por 24 h a 37°C sob agitação de 180 rpm.

Medidas da concentração de H_2O_2 *in situ* em *A. fumigatus* utilizando microeletrodo

Após o período de crescimento, os conídeos deram origem a aglomerados de micélios (*mycelium clumps*) esferóides com aproximadamente 0,3 cm de diâmetro (Figura 7 A). Cada experimento foi realizado com um aglomerado de micélios, que foi transferido para uma placa de Petri de 6 cm de diâmetro contendo 9,9 mL de MM. Primeiramente, o microeletrodo é utilizado para fazer medidas no meio líquido para posteriormente ser inserido no microambiente do micélio e realizar novas medidas. A

diferença nítida entre os voltamogramas fora e dentro do microambiente do fungo comprovam que o microeletrodo está inserido corretamente (Figura 7 B e C). A partir da confirmação da inserção do eletrodo no microambiente do fungo, medidas sucessivas foram feitas antes e após a adição de condições crescentes de H_2O_2 : 4 min de estabilização, adição de 100 μL de H_2O_2 10 mM ($C_F = 1 \text{ mM}$), 4 min de estabilização, adição de 100 μL de H_2O_2 10 mM ($C_F = 1,96 \text{ mM}$), 4 min de estabilização, adição de 200 μL de H_2O_2 10 mM ($C_F = 3,85 \text{ mM}$), 4 min de estabilização.

Ao final do experimento, as intensidades obtidas nos valores de corrente -800 mV ao longo do tempo foram plotados a fim de visualizar a concentração de H_2O_2 ao longo do tempo (lembrar que quanto mais negativo o valor em y, maior a concentração de H_2O_2).

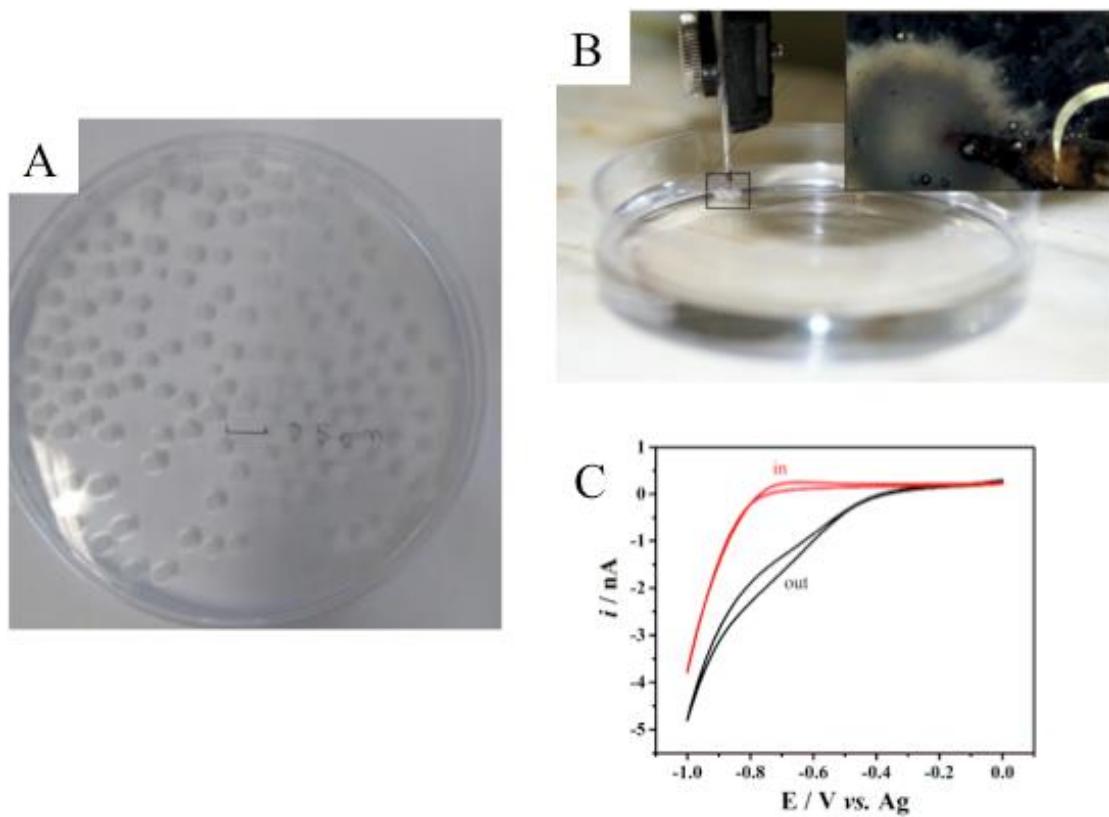


Figura 7 – A) Morfologia dos aglomerados de micélios formados após 24 h/ 37 °C/ 180 rpm do inóculo com 1×10^6 conídeos em 50 mL de Meio Mínimo. Estas estruturas foram utilizadas para os experimentos com microeletrodo. B) Microeletrodo inserido no aglomerado de micélios. Detalhe mostra a presença de bolhas próximas ao fungo após os tratamentos com H_2O_2 . C) Voltamograma indicando a diferença entre o perfil das medidas realizadas fora (curva preta) e dentro (curva vermelha) do microambiente do fungo.

Avaliação da sobrevivência de *A. fumigatus* após estresse oxidativo e inserção do eletrodo

Protocolo 1: micélios individuais foram mantidos em placa contendo Meio Mínimo (MM) e submetidos ao mesmo protocolo descrito acima. Posteriormente foram lavados por imersão em MM, então acomodados em placa sólida com meio YG (glicose 2 %, extrato de levedura 1 % e elementos traços) e mantidos a 37 °C por 48 horas. As placas foram fotografadas e o diâmetro das colônias medidos pelo software CorelDraw Graphics Suite 7 (Corel Corporation, Canadá). Os experimentos foram conduzidos em quadruplicata.

Protocolo 2: Utilizando o reagente redox alamarBlue (Thermo Fisher Scientific) que responde a atividade metabólica das células⁸⁴⁻⁸⁶. Se o organismo está viável, a atividade mitocondrial reduz o reagente, que torna-se rosa e absorve a 570 nm. Em contra partida, se o organismo morre o reagente se oxida, torna-se azul e absorve a 600 nm. Cada micélio após o tratamento e lavagem é alocado em um poço de placa de 24 poços contendo 1 mL de alamarBlue 10 % em MM. O sistema é incubado a 37 °C por 24 e 48 horas. A fim de comparar a possível diferença de viabilidade entre linhagens e diferentes tratamentos, a porcentagem diferencial de redução foi calculada segundo a equação:

$$\frac{(\varepsilon_{\text{OX}})\lambda_{600}A\lambda_{570} - (\varepsilon_{\text{OX}})\lambda_{570}A\lambda_{600}}{(\varepsilon_{\text{OX}})\lambda_{600}A^0\lambda_{570} - (\varepsilon_{\text{OX}})\lambda_{570}A^0\lambda_{600}}$$

Onde $A_{\lambda 570}$ = leitura da absorbância observada do poço teste em 570 nm; $A_{\lambda 600}$ = leitura da absorbância observada do poço teste em 600 nm; $A^0\lambda_{570}$ = leitura da absorbância observada para poço com linhagem wt em 570 nm; $A^0\lambda_{600}$ = leitura da absorbância para poço com linhagem wt em 600 nm; $(\varepsilon_{\text{OX}})\lambda_{600} = 117216$; $(\varepsilon_{\text{OX}})\lambda_{570} = 80586$.

Avaliação da virulência das diferentes linhagens de *A. fumigatus* em macrófagos (J774)

Todos os experimentos envolvendo macrófagos J774 foram realizados no Laboratório de Micologia do Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida sob total auxílio da sua aluna de doutorado Ms. Grasielle Pereira Jannuzzi (FCF – USP).

Cultivo de macrófagos J774

Macrófagos J774 foram cultivados em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (Vitrocell Embriolife) e gentamicina 40 µg/ mL (Gibco). A cultura foi mantida em atmosfera com 5 % CO₂ e 37 °C por duas passagens.

Preparação dos conídios de *A. fumigatus* para interação com macrófagos J774

As linhagens utilizadas foram: wt, ΔAfprxI, ΔAfprxB, ΔAfprxC, ΔAfprxI::ΔAfprxI⁺, ΔAfprxB::ΔAfprxB⁺ e ΔAfprxC::ΔAfprxC⁺. Estas foram crescidas a partir da solução estoque (– 80 °C) em meio sólido YAG (extrato de levedura 0,5%; glicose 2%; elementos traços 1 mL/ L) em estufa bacteriológica a 37 °C por 72 h. Em fluxo laminar de classe II, cada placa foi raspada superficialmente com 15 mL de PBS estéril utilizando uma pipeta Pasteur estéril. A solução de esporos obtida foi filtrada com papel Miracloth (Merck Millipore 475855) e contada utilizando câmara de Neubauer.

Interação entre conídeos de *A. fumigatus* e macrófagos J774

Em placas de 24 poços, 2×10^5 macrófagos J774 foram adicionados por poço, contendo 1 mL de meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (Vitrocell Embriolife). As placas foram acondicionadas por 1 h em atmosfera com 5 % CO₂ à 37 °C a fim de permitir a aderência dos macrófagos antes da interação com o fungo. Após este período, 4×10^5 conídeos foram adicionados por poço (proporção 1 macrófago : 2 fungo), sendo que para cada linhagem os experimentos foram realizados em quadruplicata técnica e duplicata biológica. A interação foi promovida por 3 e 6 horas, em atmosfera com 5 % CO₂ a 37 °C. Os experimentos foram conduzidos para contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) e para quantificação de citocina pró-inflamatória TNF-alpha.

Cálculo das Unidades Formadoras de Colônia (UFC)

Após o período de interação (3 ou 6 horas), o sobrenadante de cada poço foi coletado e acrescido de 1 mL de água Milli-Q estéril a fim de promover a lise dos macrófagos e liberar os possíveis conídeos fagocitados porém ainda viáveis. Posteriormente, esta solução foi diluída de maneira seriada 5 ×, 10 × e 10 × (totalizando uma diluição de 1000 ×) e plaqueada em meio completo YAG. Após 24 h de incubação em estufa bacteriológica a 37 °C, as Unidades Formadoras de Colônia

(UFC) foram contadas. O resultado foi analisado através do teste estatístico não-paramétrico Kruskal-Wallis, comparando todos os pares de coluna com o *post hoc* teste Dunn (GraphPad).

Quantificação de citocina pró-inflamatória TNF- α

Após o período de interação (3 ou 6 horas), o sobrenadante de cada poço foi coletado e 200 μ L foram utilizados para medida em duplicata de TNF- α através do kit Mouse TNF-alpha DuoSet ELISA (R&D Systems DY410), seguindo as orientações do fabricante.

Resultados e Discussão

Busca por Prx6 em *A. fumigatus*

Como mencionado na Introdução, Prxs da subfamília Prx6 já foram descritas como envolvidas na virulência de diversos organismos. Desta forma, buscamos no genoma de *A. fumigatus* por ORFs que pudessem codificar Prx6. Para tanto, utilizamos como referência as proteínas Prx6 humana e Prx1 de *Saccharomyces cerevisiae*, ambas da subfamília Prx6. Essas sequências foram contrastadas com o genoma de *A. fumigatus* através do software BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Das sequências encontradas, apenas foram analisadas as que tiveram cobertura maior que 50 % e identidade maior que 30 %. As duas buscas resultaram em três ORFs de possíveis Prx6 (Figura 8) (Tabela 2).

As sequências foram analisadas para verificar se elas possuíam o motivo universal das Prx PxxxT/SxxC (Pro-X-X-X-Thr/Ser-X-X-Cys)⁸⁷ e o motivo da subfamília Prx6 PVCTTE (Pro-Val-Cys-Thr-Thr-Glu)⁸⁸. A ORF AFUA_5G15070 é a única que não apresenta a sequência para o motivo universal das Prx, sendo que apenas o codon para Cys é mantido. Em contrapartida, todas as sequências possuem o motivo PVCTTE, clássico para a subfamília de interesse.

A fim de confirmar o resultado da busca, analisamos duas base de dados: Fungal Peroxidase Database (fPoxDB) e PeroxiRedoxin classification IndeX (PREX). A primeira engloba peroxidases de fungos e a segunda é exclusiva para Prxs. Na base de dados fPoxDB, encontramos as mesmas três ORFs de possíveis Prx6 (descritas como 1-Cys Prx nesta base de dados). Ao buscar as Prx6 de *A. fumigatus* no PREX, por outro lado, apenas duas sequências estavam descritas como Prx6. Isso ocorre pois somente as sequências que codificam o motivo universal das Prx (PxxxT/SxxC) são incorporadas na base de dados.

A

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments Download GenPept Graphics Distance tree of results Multiple alignment

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> AhoC/TSIA family thioredoxin peroxidase Aspergillus fumigatus Af293	213	213	96%	7e-70	52%	XP_747511.1
<input type="checkbox"/> mitochondrial peroxiredoxin Prx1 Aspergillus fumigatus Af293	205	205	88%	2e-67	54%	XP_751969.1
<input type="checkbox"/> AhoC/TSIA family thioredoxin peroxidase Aspergillus fumigatus Af293	124	124	79%	7e-36	41%	XP_753150.2
<input type="checkbox"/> allergen Aspergillus fumigatus Af293	27.3	27.3	16%	2.4	34%	XP_748198.1

B

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments Download GenPept Graphics Distance tree of results Multiple alignment

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> AhoC/TSIA family thioredoxin peroxidase Aspergillus fumigatus Af293	284	284	82%	4e-97	61%	XP_747511.1
<input type="checkbox"/> mitochondrial peroxiredoxin Prx1 Aspergillus fumigatus Af293	264	264	78%	5e-90	61%	XP_751969.1
<input type="checkbox"/> AhoC/TSIA family thioredoxin peroxidase Aspergillus fumigatus Af293	183	183	65%	3e-58	51%	XP_753150.2
<input type="checkbox"/> allergen Aspergillus fumigatus Af293	30.0	30.0	14%	0.46	32%	XP_748198.1
<input type="checkbox"/> kynureninase Aspergillus fumigatus Af293	26.2	26.2	22%	9.8	30%	XP_755369.1

Figura 8 – Resultado da busca por ORFs que codifiquem peroxirredoxinas da subfamília Prx6 em *A. fumigatus*. As sequências de referência para busca foram Prx6 de *H. sapiens* (A) e Prx1 de *S. cerevisiae* (B). Essas sequências foram contrastadas com o genoma de *A. fumigatus* através do software BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Das sequências encontradas, apenas foram analisadas as que tiveram cobertura maior que 50 % e identidade maior que 30 % (seleção em vermelho). As duas buscas resultaram em três ORFs de possíveis Prx6.

Tabela 2 – ORFs de *A. fumigatus* que potencialmente codificam peroxirredoxinas da subfamília Prx6.

Locus tag	NCBI Reference Sequence	Nome proteína
AFUA_8G07130	XP_747511.1	PrxC
AFUA_4G08580	XP_751969.1	AfPrx1
AFUA_5G15070	XP_753150.2	AfPrxB

Análises *in silico* de AfPrx1, AfPrxB e AfPrxC de *A. fumigatus*

Através das análises anteriores, já foi possível verificar que as três sequências proteicas possuem o motivo clássico para as Prx6 PVCTTE (Figura 9 – azul claro) porém AfPrxB não possui o motivo universal das Prx PxxxT/SxxC (Figura 9 – azul escuro). Outra característica intrigante de AfPrxB é que a posição da Cys catalítica é bem anterior (Cys28) em relação às proteínas homólogas (Cys ≈ 50).

As Prx6 de mamíferos foram descritas contendo localização sub-cellular dupla (citoplasma e lisossomo), sendo que a localização lisossomal está relacionada com atividade de fosfolipase do tipo A₂ (PLA₂). Considerando que as Prx estudadas neste trabalho são da subfamília Prx6, suas estruturas primárias foram analisadas quanto à

presença do peptídeo GDSWGILFSHP. Este peptídeo foi caracterizado como tendo papel no direcionamento da Prx6 de *R. norvegicus* para estruturas lisossomo-like de células epiteliais de pulmão⁷¹. Adicionalmente, foi verificada a presença da tríade catalítica para a atividade de PLA₂ destas enzimas³⁵. AfPrx1 e AfPrxC possuem peptídeo de endereçamento para estruturas lisossomo-like muito similar àquele determinado para as Prx6 de mamíferos: GDSWAILFSHP (AfPrx1) e GDSWTILFSHP (AfPrxC) (Figura 9 – verde claro). Adicionalmente, AfPrx1 e AfPrxC possuem a tríade catalítica para atividade de PLA₂ conservada (Figura 9 – verde escuro), além de apresentarem a treonina que em Prx6 de mamíferos que está envolvida com a regulação da atividade PLA₂ através de sua fosforilação (Figura 9 – vermelha)⁸⁹.

Posteriormente, as estruturas primárias das proteínas foram analisadas pelo software de predição de localização sub-celular WoLF PSORT⁷². AfPrxB e AfPrxC foram preditas como sendo proteínas mitocondriais, enquanto a AfPrx1 foi predita como sendo citoplasmática. Desta forma, apenas as enzimas AfPrxB e AfPrxC foram analisadas pelo software MitoFates⁷³, uma vez que esta ferramenta analisa sequências de endereçamento de proteínas preditas como mitocondriais. Neste caso, em AfPrxB o referido algoritmo não indicou claramente que a sequência N-terminal atua no endereçamento mitocondrial. Em contrapartida, o peptídeo N-terminal de AfPrxC apresentou alta probabilidade de atuar no endereçamento mitocondrial (0,999 de confiabilidade no resultado) (Figura 9 – rosa) (Figura 10 A). Adicionalmente, o software também foi capaz de determinar os sítios de clivagem e as enzimas envolvidas no processamento deste peptídeo: MPP e Icp55. Após análise detalhada do substrato dessas enzimas utilizando o banco de dados de peptidases MEROPS⁷⁴, foi possível observar que a região N-terminal de AfPrxC realmente possui sequência conservada para os sítios de MPP e Icp55, o que confirma a predição pelo software MitoFates (Figura 10 B).

```

>AfPrx1_(Afu4g08580)
MAQERAAPLRLGSTAPPFEADTSNGPISFKFIGDSWAILFSHPDDFTPVCTTELGAFAKLEPEFAARNV
→KLIGLSANGTD SHKAWIKDIDEVNGSKLTFPPIADPSRKIAHYDMVDYQDTTNVDEKGIAFTIRSVFII
PAKKIRLIMAYPASTGRNTAEVLRVVDALQTTDKHGVTCPINWLPGDDVIIPPPVSTEDAKKFGEIRE
VKP

>AfPrxB_(Afu5g15070)
MGHMLFKSLASNQRNHHMKSGRLHPVCTTELADLAKHQSEFAKRGVKLIGLSANSIESHDGWINDITEI
AGCSLTFLVIGDEDRKIAHTYDMLDHQDVTNVGARGIAYTIRSVFIIDPNKVIRLIQAYPASTGRSTTEL
LRVVDSLLVTDKYSVNTPANWEPGDDVVVPAGLTAQVKYPNMETVKPYLRFIPLARHHLYQH

>AfPrxC_(Afu8g07130)
MASILPRTGLRALSALPRAGPVSRVAFSRQLPRAQPLVQPFGRRFLATVPQEPRRLRGSTPNFKAQTT
→HGEIDFEFIGDSWTILFSHPADFTPVCTTELGAFAKLKGEFDKRGVKMIGLSADDLSSHGDWVKDINEV
ASTTVQFPIADPERKVAFLYDMIDQRDLDNIAEKGIPTTIRAVFFIIPAKKIRLTMLYPASTRNSAEV
LRVIDALQAADKKGIATPIDWTVGEDVIVPPSVSTEDAKKFGNVREVKPYLRYTKF

█ - Prx6 subfamily motif
█ - Peroxidase activity related residues (universal motif PxxxTxxC; catalytic triad T, C and R)
█ - Lysosomal targeting sequence (aiPLA2 activity)
█ - aiPLA2 catalytic triad
█ - Conserved Thr (phosphorilarion?)
█ - Mitochondrial presequence
█ - Uncertain N-terminal region

```

Figura 9 – Sequências das três Prx6 de *A. fumigatus*. As AfPrx1, AfPrxB e AfPrxC são pertencentes à subfamília Prx6. Os resíduos envolvidos com atividade peroxidásica estão marcados em azul. Os resíduos que compõem o motivo universal das Prx (PxxxTxxC, em que T e C pertencem à tríade catalítica) e a arginina catalítica estão destacados em azul escuro. O motivo PVCTTE, assinatura das Prx6, está destacado em azul claro. De acordo com os programas de predição de localização sub-cellular, AfPrx1 é citoplasmática e AfPrxB e AfPrxC são mitocondriais, entretanto apenas AfPrxC possui sequência de endereçamento mitocondrial clara (resíduos marcados em rosa). Adicionalmente, AfPrxB e AfPrxC podem também ter localização adicional lisossomal (resíduos marcados em verde claro) de acordo com o descrito por Sorokina e colaboradores em 2009⁷¹. As proteínas da subfamília Prx6 que possuem localização lisossomal desempenham função de fosfolipase do tipo A₂ (PLA₂), utilizando os resíduos da tríade catalítica H, S e D (marcados em verde escuro)³⁵.

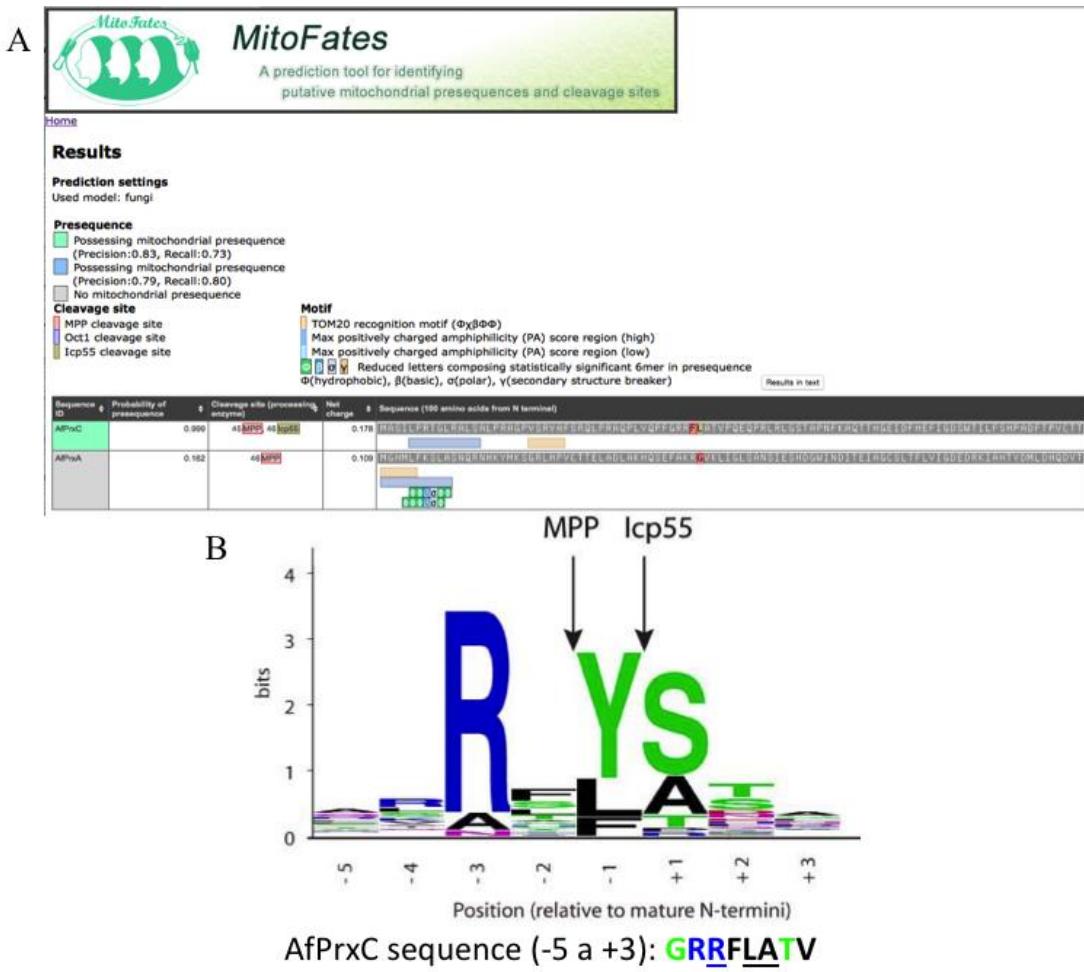


Figura 10 – Análises de pré-sequência mitocondrial para AfPrxB e AfPrxC. A) Resultado da análise do software MitoFates para as proteínas AfPrxB e AfPrxC. AfPrxB não apresenta pré-sequência de endereçamento mitocondrial clara. AfPrxC apresenta pré-sequência de endereçamento mitocondrial típica (probabilidade de 0,999) e sítio de clivagem para as enzimas MPP e Icp55. B) Gráfico que representa a frequência de aminoácidos na região N-terminal de proteínas que apresentam pré-sequência mitocondrial que é processada por MPP e Icp55 (extraído ⁶⁵). Destaque da sequência N-terminal de AfPrxC com os resíduos conservados dos substratos de MPP e Icp55 sublinhados. Resíduos coloridos da seguinte forma: resíduos polares sem carga (G, S, T, Y, C, Q, N) em verde, resíduos básicos (K, R, H) em azul, resíduos ácidos (D, E) em vermelho e resíduos hidrofóbicos (A, V, L, I, P, W, F, M) em preto.

Clonagem, expressão e purificação de Prx6 de *A. fumigatus*

Após a identificação dos três potenciais genes de Prx6 em *A. fumigatus*, iniciamos a clonagem destes genes para posterior expressão e purificação das respectivas proteínas recombinantes. Por se tratarem de genes de organismo eucarioto, as sequências processadas (sem íntrons), bem como a tradução das ORFs (sequências de aminoácidos) foram obtidas através do banco de dados AspGD.

Os primeiros testes de expressão foram realizados em *E. coli* linhagem BL21 (*DE3*). A proteína AfPrx1 foi superexpressa na fração solúvel em ambas as condições (20 °C e 37 °C) (Figura 11 A), com rendimento superior a 40 mg por litro de cultura. Já a proteína AfPrxC não foi expressa nos primeiros testes (Figura 11 A). Uma vez que a isoforma de AfPrxC que foi clonada possui a pré-sequência de endereçamento mitocondrial, imaginou-se que esses resíduos pudessem estar interferindo de maneira negativa na expressão da enzima. Desta forma, foi decidido clonar AfPrxC sem a pré-sequência. O resultado do teste de expressão de AfPrxC sem pré-sequência resultou na proteína superexpressa e solúvel tanto a 20 °C quanto a 37 °C (Figura 11 B), com rendimento superior a 40 mg por litro de cultura.

Uma curiosidade a respeito destas linhagens de BL21 (*DE3*) transformadas com pET15b/*Afprx1* e pET15b/*AfprxC* sem peptídeo sinal é que elas precisam ser retransformadas a cada expressão, caso contrário a bactéria adquire morfologia filamentosa, fica muito sensível a choque osmótico e o rendimento de expressão cai drasticamente.

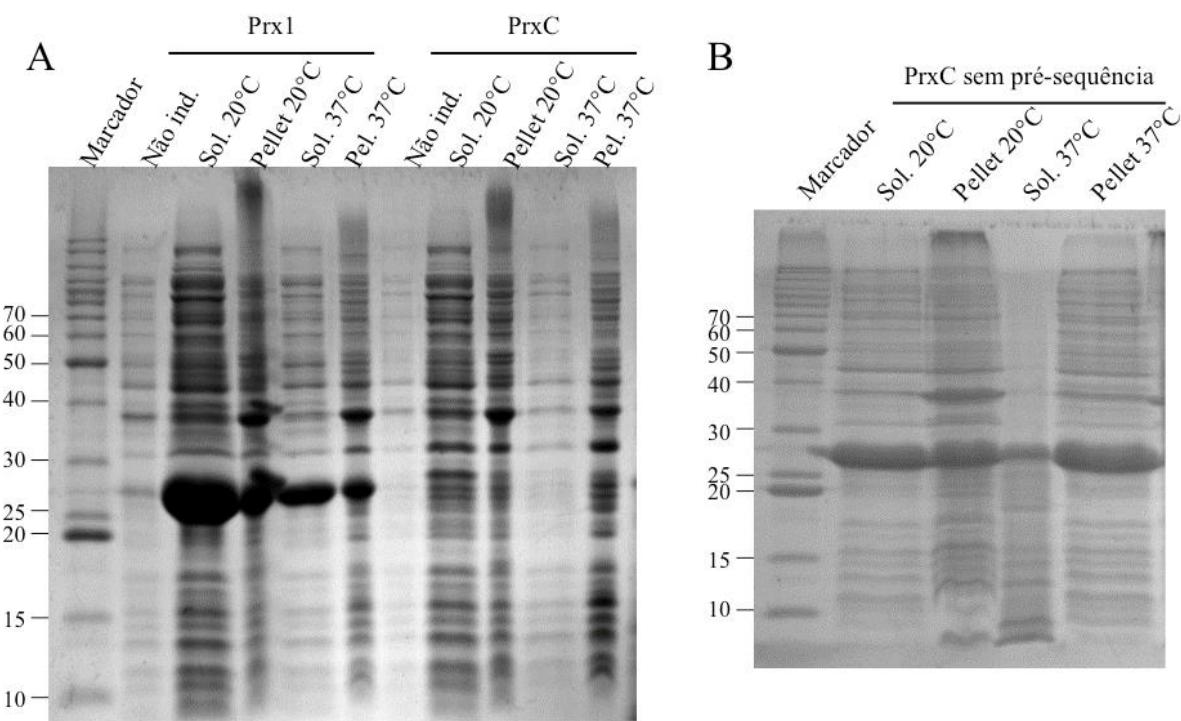


Figura 11 – Resultado de teste de expressão das proteínas AfPrx1, AfPrxC e AfPrxC sem pré-sequência. A) Pode-se perceber que AfPrx1 foi superexpressa na fração solúvel tanto a 20 °C e 37 °C, enquanto AfPrxC não foi expressa em nenhuma das condições. B) Após a retirada da pré-sequência de AfPrxC, esta proteína foi superexpressa na fração solúvel em ambas as condições. Marcador: *BenchMark™ Unstained Protein Ladder*.

Enquanto AfPrx1 e AfPrxC (sem a pré-sequência) foram expressas na fração solúvel com alto rendimento, a proteína AfPrxB foi expressa apenas na fração insolúvel apesar das diversas tentativas, descritas abaixo:

- Expressão em BL21 (*DE3*) utilizando gene otimizado, assim como feito para as outras duas Prx;
- Expressão em BL21 (*DE3*) utilizando isoforma mais curta do gene (presente em outros bancos de dados, com 54 pares de base a menos) feita a partir de clonagem do cDNA de *A. fumigatus* Afu293;
- Expressão em BL21 (*DE3*) utilizando isoforma longa do gene feita a partir de clonagem do cDNA de *A. fumigatus* Afu293. Um detalhe importante é que quando esta clonagem foi realizada, todos os clones obtidos revelaram a presença de um íntron no RNAm (observação: o primeiro códon deste íntron é um *stop* códon) (Figura 12). Este resultado foi repetido para outros lotes de cDNA, inclusive de outra linhagem de *A. fumigatus* (Δ akuB^{ku80}). Análises de bioinformática realizadas a partir de experimentos de RNA-seq (total: 46 experimentos) revelam que este íntron aparece em parte dos experimentos. Com base nestes dados, resolvemos clonar a isoforma longa de AfPrxB utilizando um primer *forward* que continha: sítio para *NdeI*, as 54 bases que seriam adicionadas e região de homologia com o gene já clonado no pET15b. Mesmo após esta tentativa, a proteína foi expressa apenas na fração solúvel;
- Testes de expressão com a proteína AfPrxB C28S em diferentes linhagens de *E. coli*: BL21 (*DE3*); BL21 (*DE3*) C41; BL21 (*DE3*) C43; BL21 (*DE3*) Groel; Origami (*DE3*); BL21 (*DE3*) pLysS; BL21 (*DE3*) pLysE; Rosetta (*DE3*) e BL21 (*DE3*) CodonPlus RIPL;
- Teste de ressolubilização da proteína AfPrxB C28S utilizando alta pressão em colaboração com Dra. Ligia Ely Morganti Ferreira Dias (IPEN – USP)
- Tentativa de expressão da proteína AfPrxB C28S em *Pichia pastoris* em colaboração com Dr. Robert Ryan Geyer no laboratório da Profa. Dra. Ohara Augusto (IQ – USP)

A sequência da proteína putativa AfPrxB apresenta características bem distintas das outras Prx. Entre as alterações mais marcantes está o encurtamento da

região N-terminal, o que acarreta no posicionamento da Cys catalítica aproximadamente 20 aminoácidos antes se comparado com as proteínas homólogas. Adicionalmente, o motivo assinatura das Prx PxxxT/SxxC está praticamente todo alterado em AfPrxB SxxxHxxC, com aminoácidos de características físico-químicas bem distintas. Além destas alterações perceptíveis na estrutura primária, a possível presença de um ítron foi predita nos clones que obtivemos em clonagem a partir de cDNA. Essa observação foi intrigante, principalmente pelo fato do primeiro códon ser um códon de terminação (TAA) (Figura 12). Além desta evidência experimental da presença do códon de terminação/ ítron em RNAm, também foi observada essa presença em transcriptomas de RNAseq. Outro detalhe importante é que a proteína AfPrxB não foi detectada em nenhum dos experimentos de proteômica que analisamos, enquanto as proteínas AfPrx1 e AfPrxC foram descritas em alguns, principalmente nos que se referem a resposta a estresse oxidativo^{90–107}. Dessa forma, decidimos continuar com os experimentos apenas com AfPrx1 e AfPrxC. Tanto AfPrx1 como AfPrxC foram obtidas com alto grau de pureza após purificação por IMAC (Figura 13).

AhpC/TSA family thioredoxin peroxidase [Aspergillus fumigatus Af293]
Sequence ID: [ref|XP_753150.2|](#) Length: 205 Number of Matches: 1
[► See 1 more title\(s\)](#)

Range 1: 3 to 205		GenPept	Graphics	▼ Next Match	▲ Previous Match	
Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
414 bits(1064)	2e-146	Compositional matrix adjust.	203/219(93%)	203/219(92%)	16/219(7%)	-1
Query 701		HMLFKSLASNQRNHK*SRGSWQSPNSMVARYMKSGRLHPVCTTELADLAKHQSEFAKRG		522		
		HMLFKSLASNQRNHK	YMKSGRLHPVCTTELADLAKHQSEFAKRG			
Sbjct 3		HMLFKSLASNQRNHK-----	YMKSGRLHPVCTTELADLAKHQSEFAKRG	46		
Query 521		VKLIGLSANSIESHDGWNDITEIAGCSLTFLVIQDDEDRKIAHTYDMLDHQDVTVNVGARG		342		
		VKLIGLSANSIESHDGWNDITEIAGCSLTFLVIQDDEDRKIAHTYDMLDHQDVTVNVGARG				
Sbjct 47		VKLIGLSANSIESHDGWNDITEIAGCSLTFLVIQDDEDRKIAHTYDMLDHQDVTVNVGARG		106		
Query 341		IAYTIRSVFIIDPNKVIRLIQIAYPASTGRSTTELLRVVDSDLVTDKYSVNTPANWEPGDD		162		
		IAYTIRSVFIIDPNKVIRLIQIAYPASTGRSTTELLRVVDSDLVTDKYSVNTPANWEPGDD				
Sbjct 107		IAYTIRSVFIIDPNKVIRLIQIAYPASTGRSTTELLRVVDSDLVTDKYSVNTPANWEPGDD		166		
Query 161		VVPAGLTAEEAQVKYPNMETVKPYLRFIPLARHHLYQH	45			
		VVPAGLTAEEAQVKYPNMETVKPYLRFIPLARHHLYQH				
Sbjct 167		VVPAGLTAEEAQVKYPNMETVKPYLRFIPLARHHLYQH	205			

Figura 12 – Resultado do BLASTx (*Basic Local Alignment Search Tool – BLASTX search protein databases using a translated nucleotide query*) realizado com resultado do sequenciamento de clone de *AfprxB*. É possível notar a presença do ítron correspondente a 54 pb.

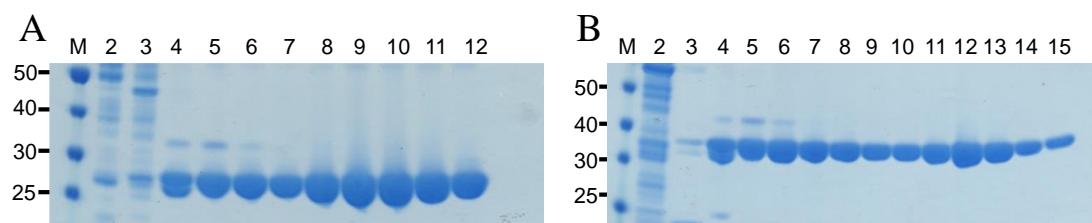


Figura 13 – Resultado de expressão e purificação das Prx6 de *A. fumigatus*. AfPrx1 (A) e AfPrxB (B) foram expressas como cauda de histidina e purificadas por cromatografia de afinidade a metal (IMAC) utilizando gradiente de imidazol. O marcador de peso molecular (M) está expresso em kDa. As *lanes* seguintes possuem o eluído das frações do gradiente de imidazol (20 – 500 mM). Apenas as frações de alta pureza foram utilizadas nos ensaios: lanes 8 – 12 para AfPrx1 e 9 – 15 para AfPrxC.

Caracterização da estrutura quaternária de AfPrx1 e AfPrxC

Após a clonagem dos genes de *A. fumigatus* pertencentes a subfamília Prx6 e padronização da expressão e purificação das proteínas correspondentes, iniciamos a caracterização estrutural destas enzimas. Para tanto, AfPrx1 (25,555 kDa) e AfPrxC (26,843 kDa) foram submetidas a Cromatografia de Exclusão Molecular (SEC), Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo (SAXS). Em todos os experimentos, as proteínas foram analisadas em sua forma reduzida (100 equivalentes de DTT ou 20 equivalentes de TCEP) e oxidada (1,2 equivalentes de H₂O₂).

Cromatografia de Exclusão Molecular (SEC)

Utilizando o método de SEC, é possível observar que as estruturas quaternárias de AfPrx1 e AfPrxC são independentes de seu estado redox e que os tempos de eluição foram consistentes com estruturas monoméricas ou diméricas (Figura 14). Entretanto, Prxs da subfamília Prx6 classicamente possuem a estrutura dimérica como unidade catalítica básica, ou seja, estas proteínas formam homodímeros antiparalelos, podendo ou não formar estruturas maiores (como o decâmero, que seria um pentâmero de dímeros)¹⁰⁸. Dessa forma, foi importante analisar o grau de oligomerização dessas proteínas por outros métodos.

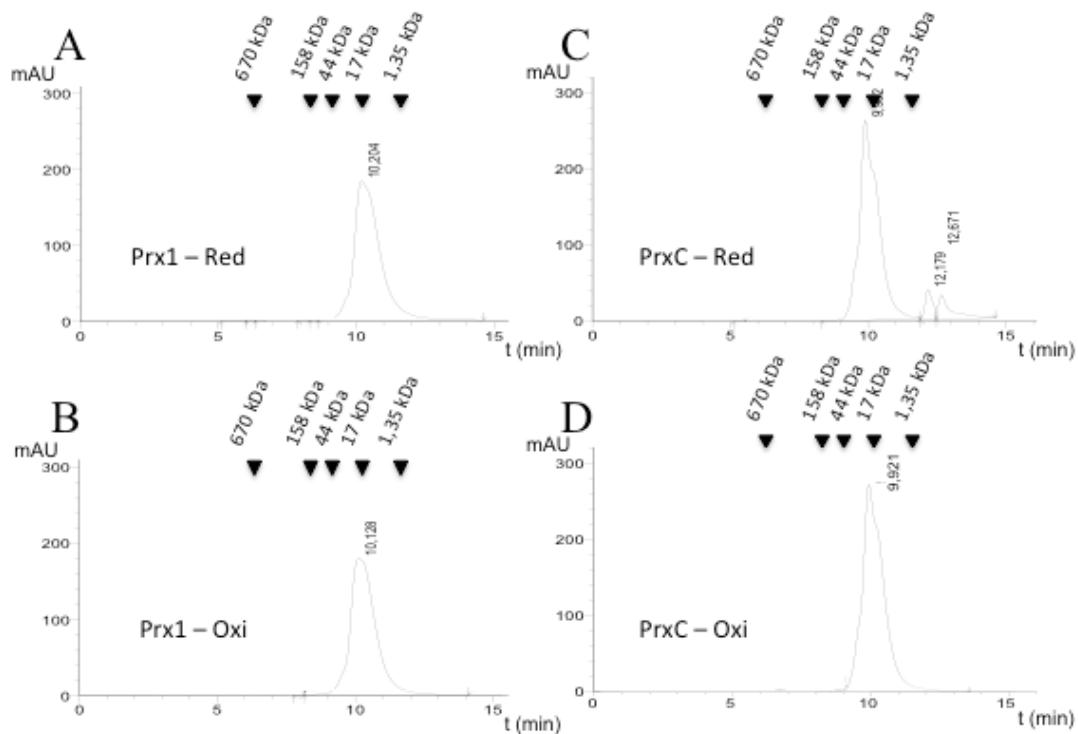


Figura 14 – Resultado de Cromatografia de Exclusão Molecular (SEC) de AfPrx1 (A e B) e AfPrxC (C e D). A redução das amostras foi realizada com 100 equivalentes de DTT (A e C) e a oxidação das amostras foi realizada com 1,2 equivalentes de H₂O₂ (B e D). A coluna utilizada foi Phenomenex Yarra SEC-3000 em fluxo 1 mL/ min. Os padrões de peso molecular utilizados foram: tioglobulina (670 kDa), gama tubulina bovina (158 kDa), ovalbumina (44 kDa), mioglobulina (17 kDa) e vitamina B₁₂ (1,35 kDa) e estão assinalados com setas pretas no topo da figura (Gel Filtration Standard 151-1901 BioRad).

Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

Foi utilizado como outro método de avaliação da estrutura quaternária das enzimas estudadas o Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS). Através da medida do DLS, é possível obter informações sobre o tamanho das partículas suspensas em meio líquido. Nesta técnica um *laser* incide sobre a amostra e a intensidade da luz espalhada depende do número de partículas presentes na amostra. Os resultados foram obtidos apenas para AfPrx1 até o momento. A baixa polidispersidade das amostras (aproximadamente 11,5 %) revela que as amostras proteicas são uniformes e, desta forma, apresentam-se em apenas um estado oligomérico (apenas dímero para AfPrx1) de maneira independente do estado redox.

Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo (SAXS)

As Prx de *A. fumigatus* também foram analisados pelo método de Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo (SAXS), em diferentes concentrações (5 mg/ mL e 24 mg/ mL) e estados redox (sem tratamento, reduzida e oxidada). Os resultados mostram que a concentração das proteínas, bem como seus estados redox não interferem de maneira significativa na oligomerização destas enzimas e que AfPrx1 e AfPrxC são proteínas diméricas (Tabela 3). Como mencionado anteriormente, esses estudos foram realizados com o suporte do prof. Dr. Cristiano Oliveira e de sua aluna Maximila Frazão de Souza (Instituto de Física – USP).

De acordo com os dados estruturais obtidos até o momento, AfPrx1 e AfPrxC são proteínas diméricas independente de estado redox e concentração.

Tabela 3 – Resultado das análises da estrutura quaternária de AfPrx1 e AfPrxC de *A. fumigatus* por SEC, SAXS e DLS em diferentes estados de oxidação.

	AfPrx1 (25,56 kDa)		AfPrxC (26, 84 kDa)	
	Red	Oxi	Red	Oxi
SEC	Monômero ou dímero	Monômero ou dímero	Monômero ou dímero	Monômero ou dímero
SAXS	60 kDa	63 kDa	43 kDa	38 kDa
DLS	63 kDa	62 kDa	ND	ND
Provável estado oligomérico	Dímero	Dímero	Dímero	Dímero

Avaliação da atividade peroxidásica com H₂O₂

Foram realizados ensaios de cinética competitiva com HRP a fim de determinar a constante de segunda ordem de AfPrx1 e AfPrxC com H₂O₂. As análises dos espectros indicam que a oxidação de HRP a composto I é inibida de forma dose-dependente das duas proteínas (Figura 15). Para AfPrx1 a constante de segunda ordem foi determinada como $2 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ e para AfPrxC foi $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Figura 16). As constantes de segunda ordem estão diretamente relacionadas com a velocidade da reação ($v = k [\text{Prx}] \times [\text{H}_2\text{O}_2]$) e constantes na ordem de $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ são extremamente altas. A termo de comparação, as reações mais rápidas conhecidas possuem constante na ordem de $10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ que representa o limite difusional das moléculas¹⁰⁹. Apesar de muito altos, estes valores não são surpreendentes já que as Prx de maneira geral são enzimas extremamente reativas com hidroperóxidos^{25,54,77,110–114}. Estes resultados fazem parte do manuscrito “Analyses of the three 1-Cys Prx from *Aspergillus fumigatus* reveal that cytosolic AfPrx1 is central to

H₂O₂ metabolism and virulence” do grupo do Prof. Dr. Iran Malavazi (UFSCar), publicado na revista *Scientific Reports* (Anexo I)¹¹⁵.

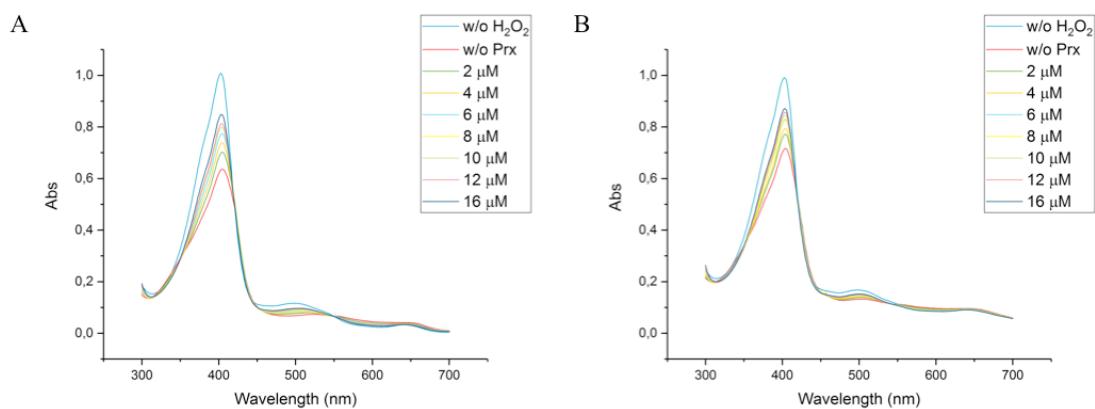


Figura 15 – espectro da HRP para determinação da constante de segunda ordem da reação entre H₂O₂ e AfPrx1 (A) e AfPrxC (B). A HRP reduzida absorve a 403 nm (curva w/o H₂O₂). Após adição sub-estequiométrica de H₂O₂ a HRP férrica, é possível observar um considerável decaimento na absorbância a 403 nm devido a formação da HRP-composto I (curva w/o Prx). A cinética competitiva ocorre após a adição de concentrações crescentes de Prx (2, 4, 6, 8, 10, 12 e 16 μM). Quanto maior a concentração da Prx, menor a fração de HRP que se oxida e menor é a diferença de absorbância em comparação com a HRP reduzida.

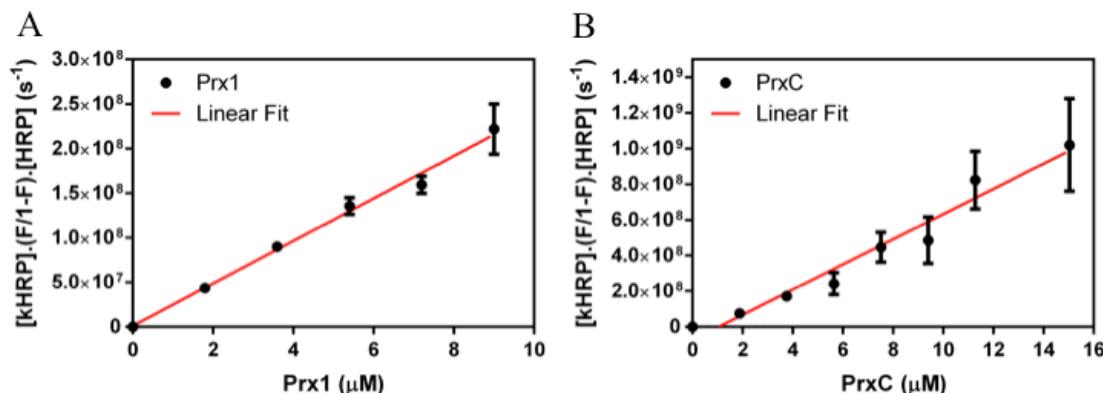


Figura 16 - Cálculo das constantes de segunda ordem para as peroxiredoxinas da subfamília Prx6 de *A. fumigatus*. As constantes de segunda ordem das Prx foram calculadas a partir da inclinação da reta obtida da dispersão dos pontos considerando a concentração de Prx e o valor obtido no ensaio de cinética competitiva com HRP. A) AfPrx1 $k = 2 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ e B) AfPrxC $k = 5,6 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Avaliação da atividade peroxidásica de AfPrx1 e AfPrxC frente diferentes hidroperóxidos

AfPrx1 e H₂O₂

Primeiramente, as reações entre AfPrx1 reduzida (AfPrx1-S⁻) e H₂O₂ foram avaliadas em pH 7,1. Nestas condições, foi possível verificar a existência de um passo de reação rápido ($t_{1/2} = 0,01$ s), com queda de fluorescência, seguido por outro muito mais lento ($t_{1/2} = 0,63$ s), com aumento de fluorescência. Enquanto o passo rápido possuía uma variação de fluorescência pequena e difícil de analisar, o segundo passo apresentava variação de fluorescência muito significativa (aproximadamente 1,5 UA). Para as concentrações de até 20 μM, o k_{obs} desta reação mais lenta não se alterou, ficando próximo de 1,1 s⁻¹. Entretanto, para as concentrações mais altas de H₂O₂ (4 – 20 mM) a velocidade da reação foi dependente da concentração do peróxido. Desta forma, foi possível calcular a constante de segunda ordem desta reação $k = 153,68\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$, pH 7,1 e 25 °C (Figura 17 C). Assumimos que essa constante refere-se à reação de superoxidação de AfPrx1 por H₂O₂.

A fim de buscar a constante de oxidação de AfPrx1 por H₂O₂, seria necessário melhorar o dado obtido para a primeira parte da reação. Tentativas com a diminuição da concentração de Prx foram realizadas, porém sem sucesso. Passamos então para testes em diferentes pHs (7,6 – 6,0). Verificamos que quanto menor o pH da reação, mais lenta era a segunda fase reação, enquanto que a velocidade da primeira fase mantinha-se praticamente constante. Provavelmente devido a melhor separação entre as duas etapas da reação, o delta de fluorescência da primeira fase ficou maior, favorecendo as medidas e, consequentemente, possibilitando os cálculos (Figura 17 A). Desta forma, todos os ensaios de cinética de oxidação de AfPrx1 foram conduzidos em pH 6. Assim, a constante de segunda ordem da oxidação de AfPrx1 por H₂O₂ foi calculada como $1,5 \times 10^7\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$, pH 6,4 e 25 °C. Portanto, este valor de k foi próximo ao obtido pelo método de cinética competitiva com HRP (Figura 17 B), validando o ensaio de fluorescência.

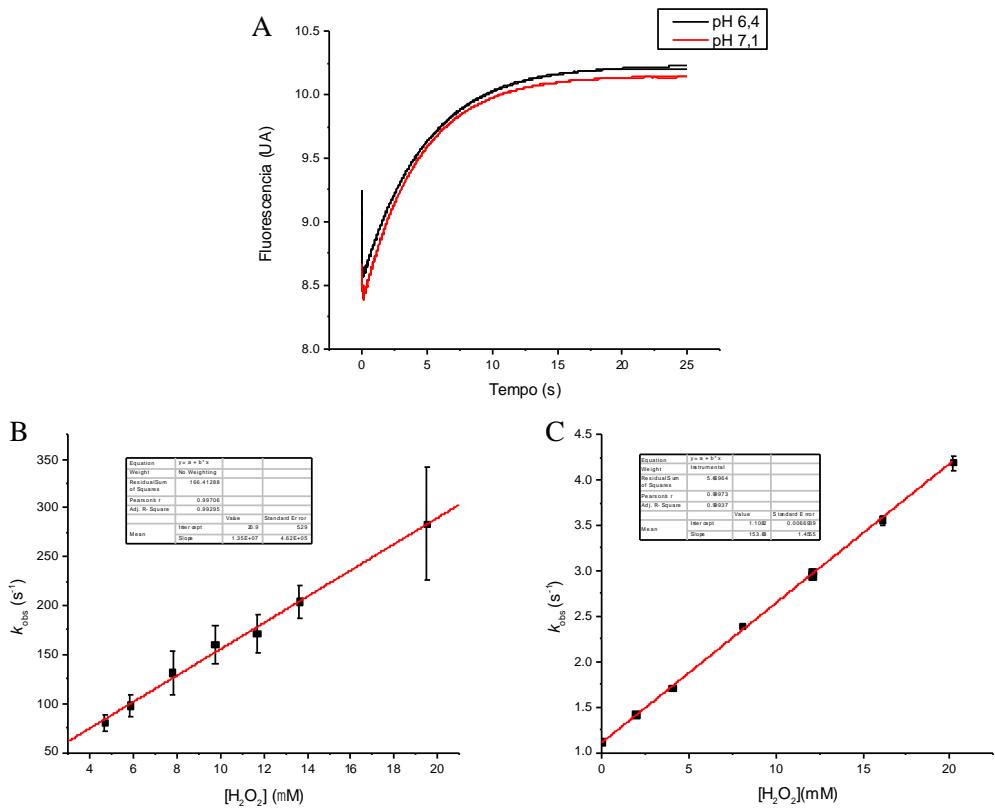


Figura 17 – Cinética da oxidação e superoxidação de AfPrx1 por H_2O_2 . A) Perfil cinético da fluorescência em pH 6,4 (curva preta) e pH 7,1 (curva vermelha). É possível notar que a reação é bifásica, sendo a primeira fase rápida, representada pela queda da fluorescência, e outra mais lenta, representada pela subida de fluorescência. B) Cinética de oxidação de AfPrx1 por H_2O_2 . As reações continham: 0,5 μM de AfPrx1, tampão 1 \times (Tris 30 mM; MES 15 mM; ácido acético 15 mM; NaCl 120 mM; DTPA 0,05 mM pH 7,1), H_2O_2 em concentrações variadas com ácido acético para ajustar pH final 6,4. C) Cinética de superoxidação de AfPrx1 por H_2O_2 . As reações continham: 0,5 μM de AfPrx1, tampão 1 \times (Tris 30 mM; MES 15 mM; ácido acético 15 mM; NaCl 120 mM; DTPA 0,05 mM pH 7,1), H_2O_2 em concentrações variadas.

AfPrx1 e *t*-BOOH

A reação entre AfPrx1 reduzida e *t*-BOOH em excesso também apresentou perfil bifásico, com rápido decaimento na fluorescência, seguido pela fase lenta de aumento na fluorescência. A constante de oxidação e superoxidação de AfPrx1 por *t*-BOOH foi determinada como $1,3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ e $22 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectivamente, em pH 6,0 e 25 °C (Figura 18).

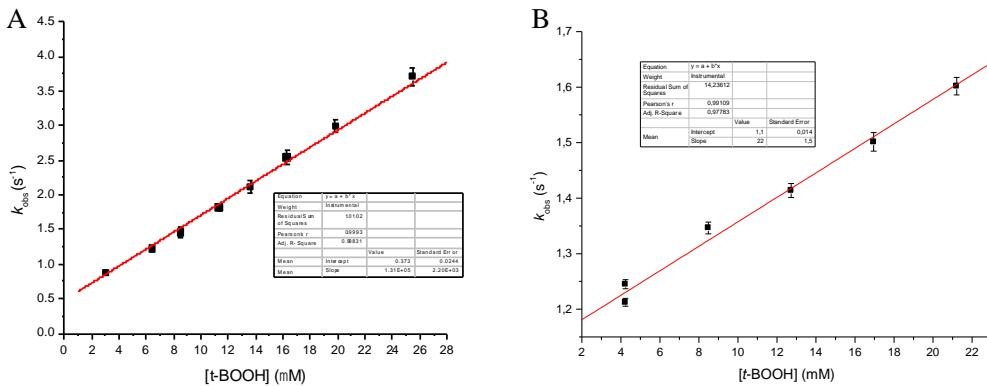


Figura 18 – Cinética da oxidação e superoxidação de AfPrx1 por *t*-BOOH. A) Cinética de oxidação de AfPrx1 por *t*-BOOH. As reações continham: 0,5 µM de AfPrx1, tampão 1 × (Tris 30 mM; MES 15 mM; ácido acético 15 mM; NaCl 120 mM; DTPA 0,05 mM pH 7,1), *t*-BOOH em concentrações variadas com ácido acético para ajustar pH final 6,0. B) Cinética de superoxidação de AfPrx1 por *t*-BOOH. As reações continham: 0,5 µM de AfPrx1, tampão 1 × (Tris 30 mM; MES 15 mM; ácido acético 15 mM; NaCl 120 mM; DTPA 0,05 mM pH 7,1), *t*-BOOH em concentrações variadas.

AfPrx1 e CuOOH

A constante de segunda ordem de oxidação de AfPrx1 por CuOOH foi determinada como $1,98 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, em pH 6,0 e 25 °C, representada pelo decaimento rápido da fluorescência de AfPrx1 (Figura 19). A constante de superoxidação não foi calculada, porque não pudemos usar altas concentrações desse peróxido devido à sua baixa solubilidade.

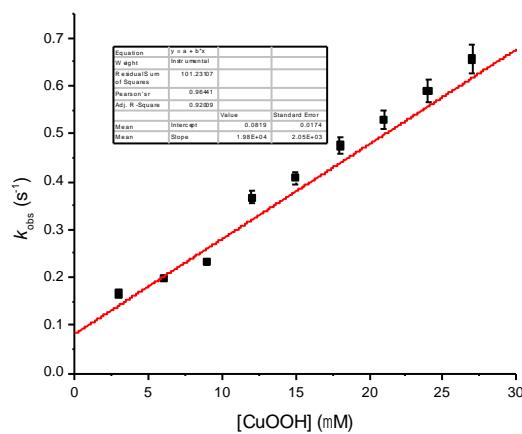


Figura 19 – Cinética da oxidação de AfPrx1 por CuOOH. As reações continham: 0,5 µM de AfPrx1, tampão 1 × (Tris 30 mM; MES 15 mM; ácido acético 15 mM; NaCl 120 mM; DTPA 0,05 mM pH 7,1), CuOOH em concentrações variadas com ácido acético para ajustar pH final 6,0.

AfPrx1 e LAOOH

Também foi avaliada a oxidação de AfPrx1 por LAOOH. A primeira fase reação (rápido decaimento da fluorescência) foi calculada como sendo $7,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, em pH 6,0 e 25 °C (Figura 20 B). A constante de superoxidação não pode ser calculada devido à solubilidade limitada de LAOOH. Importante ressaltar que foram avaliados três solventes para LAOOH: soluções contendo etanol 1 %, tween 20 1 % ou triton 100 1 %. A concentração dos solventes na reação final era de 0,5 %. Utilizar etanol 1 % como solvente de LAOOH foi a melhor opção já que a presença de 0,5 % de etanol não alterou a atividade enzimática nem a fluorescência proteica, como pode-se verificar pelo gráfico curso temporal da reação (Figura 20 A).

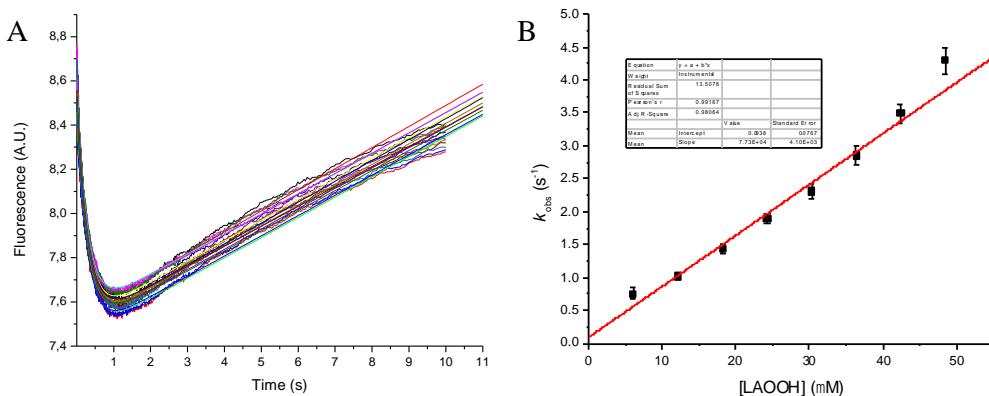


Figura 20 – Cinética da oxidação de AfPrx1 por LAOOH. As reações continham: 0,5 μM de AfPrx1, tampão 1 × (30 mM Tris; 15 mM MES; 15 mM ácido acético; 120 mM NaCl; 0,05 mM DTPA pH 7,1), LAOOH em concentrações variadas em 0,5 % etanol e com ácido acético para ajustar pH final 6,0. A) Gráfico curso temporal da reação de oxidação de AfPrx1 por LAOOH 43,75 μM. B) Cinética de oxidação de AfPrx1 por LAOOH.

AfPrx1 e ONOO⁻

A constante de oxidação de AfPrx1 por ONOO⁻ foi calculada como $1,1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, em pH 6,5 a 25 °C (Figura 21 B). Apesar de ONOO⁻ ser relativamente instável, obtivemos bons gráficos curso temporais, o que possibilitou os cálculos da constante da reação (Figura 21 A).

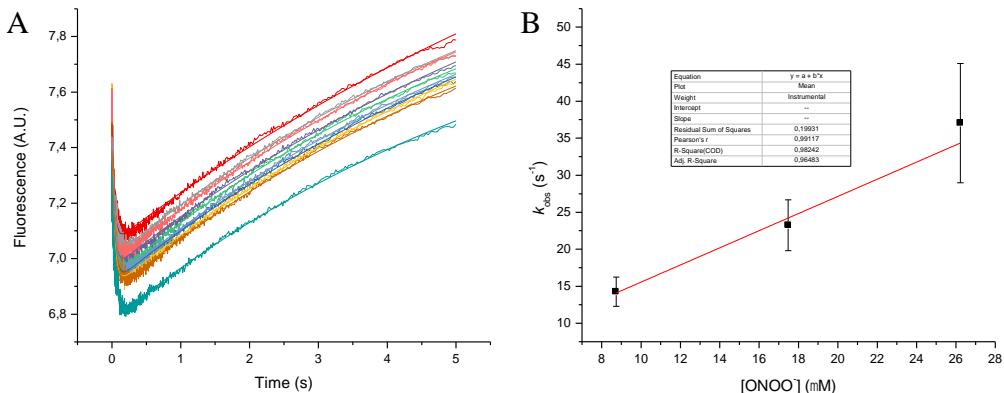


Figura 21 – Cinética da oxidação de AfPrx1 por ONOO⁻. As reações continham: 0,5 μM de AfPrx1, tampão 50 mM de fosfato de sódio pH 6,0, ONOO⁻ em concentrações variadas em 2,5 mM NaOH (pH final 6,55). A) Gráfico curso temporal da reação de oxidação de AfPrx1 por ONOO⁻ (17,5 μM). B) Cinética de oxidação de AfPrx1 por ONOO⁻.

AfPrxC e H₂O₂

Avaliamos primeiramente o comportamento da reação entre AfPrxC reduzida (AfPrxC-S⁻) e H₂O₂, em pH 7,1. Foi possível verificar que a reação também seguiu o padrão bifásico, com uma primeira reação mais rápida representada pela queda de fluorescência, e outra reação mais lenta, representada por aumento na fluorescência. De maneira similar ao ocorrido com AfPrx1, a primeira fase da reação entre AfPrxC-S⁻ e H₂O₂ também apresentou delta de fluorescência muito pequeno (0,08 UA). Curiosamente, o delta de fluorescência ficou mais evidente (favorecendo o ajuste da curva em equação) ao subirmos o pH para 7,85 (Figura 22 A). Como, mesmo com a alteração de pH, o delta ainda era pequeno, refletindo em grandes erros, testou-se diferentes forças iônicas para conduzir a reação. O melhor delta de fluorescência foi obtido para a menor força iônica testada (30 mM) (Figura 22 B). Desta forma, os ensaios de cinética de oxidação de AfPrxC foram conduzidos em pH 7,85 e força iônica de 30 mM.

Assim, a constante de segunda ordem da oxidação de AfPrxC por H₂O₂ foi calculada como $3,3 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, pH 7,85 e 25 °C. Este valor de k foi próximo ao obtido pelo método de cinética competitiva com HRP (Figura 22 C), validando o ensaio de fluorescência. Utilizando concentrações mais altas de H₂O₂ (2 – 20 mM) foi possível calcular a constante de segunda ordem da segunda fase da reação $k = 97 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, pH 7,1 a 25 °C (Figura 22 D). Assumimos que essa constante refere-se à reação de superoxidação de AfPrxC por H₂O₂.

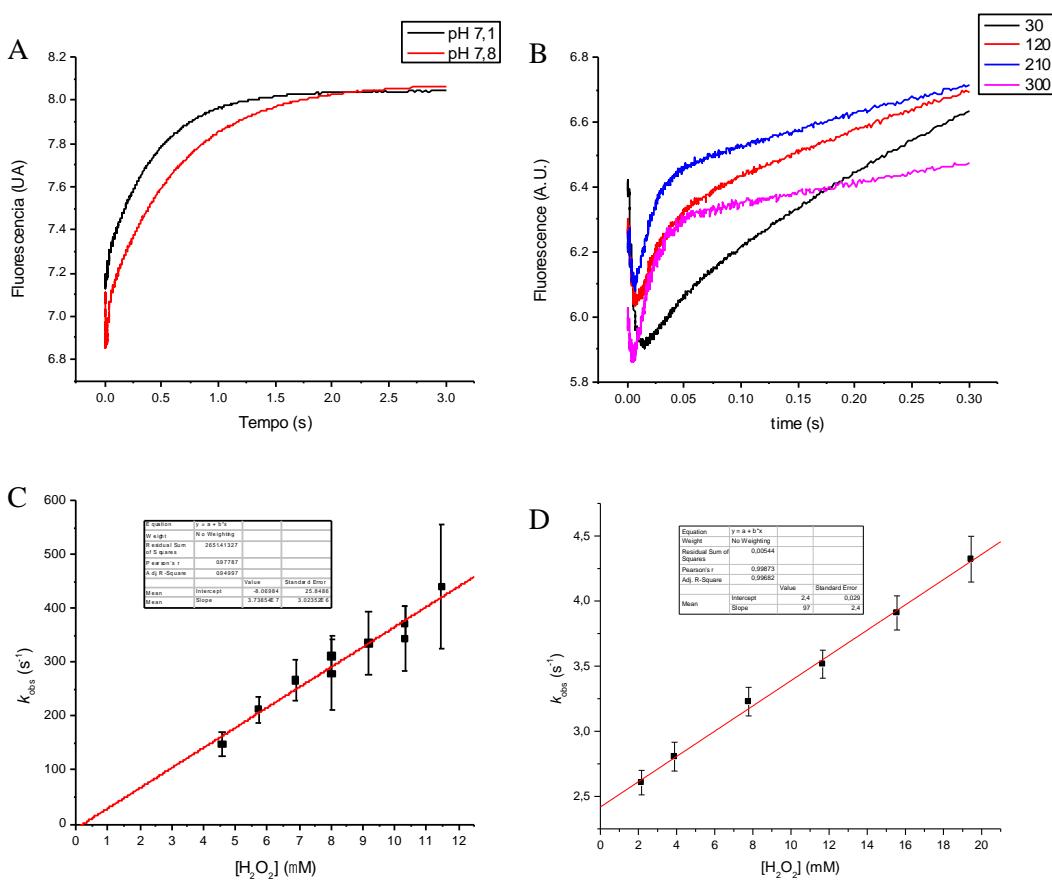


Figura 22 – Cinética da oxidação e superoxidação de AfPrxC por H_2O_2 . A) *Time course* da reação em pH 7,1 (curva preta) e pH 7,8 (curva vermelha). É possível notar que a reação é bifásica, sendo a primeira fase rápida, representada pela queda da fluorescência, e outra mais lenta, representada pela subida de fluorescência. A reação em pH 7,8 favoreceu a visualização da primeira reação, já que seu delta de fluorescência ficou maior. B) *Time course* da reação com diferentes forças iônicas (30, 120, 210 e 300 mM). A menor força iônica aumentou o delta de fluorescência da primeira fase da reação. C) Cinética de oxidação de AfPrxC por H_2O_2 . As reações continham: 1 μ M de AfPrxC, tampão 1 × (Tris 30 mM; MES 15 mM; ácido acético 15 mM; DTPA 0,05 mM pH 7,1) H_2O_2 em concentrações variadas com NaOH para ajustar pH final 7,8. C) Cinética de superoxidação de AfPrxC por H_2O_2 . As reações continham: 1 μ M de AfPrx1, tampão 1 × (Tris 30 mM; MES 15 mM; ácido acético 15 mM; NaCl 120 mM; DTPA 0,05 mM pH 7,1), H_2O_2 em concentrações variadas.

AfPrxC e t-BOOH

A reação entre AfPrxC- S^- e *t*-BOOH também apresentou perfil bifásico, com rápido decaimento na fluorescência, seguido pela fase lenta de aumento na fluorescência. A constante de oxidação de AfPrxC mediada por *t*-BOOH foi determinada como $4,1 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$, em pH 7,85 (com baixa força iônica) a 25 °C (Figura 23 A). Utilizando concentrações mais altas de peróxido, foi possível calcular a constante de segunda ordem da segunda fase da reação $k = 73,5 M^{-1} s^{-1}$, em pH 7,85

e 25 °C (Figura 23 B). Assumimos que essa constante refere-se à reação de superoxidação de AfPrxC por *t*-BOOH.

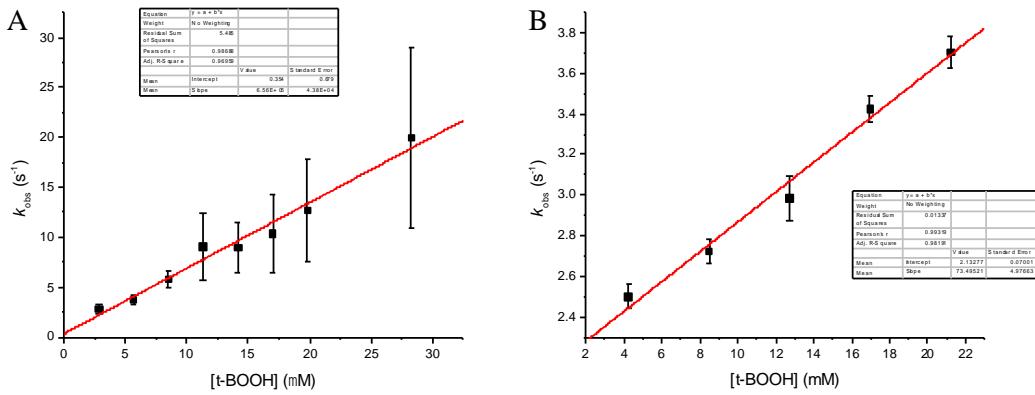


Figura 23 – Cinética da oxidação e superoxidação de AfPrxC por *t*-BOOH. A) Cinética de oxidação de AfPrxC por *t*-BOOH. As reações continham: 1 μ M de AfPrxC, tampão 1 \times (Tris 30 mM; MES 15 mM; ácido acético 15 mM; DTPA 0,05 mM pH 7,1), *t*-BOOH em concentrações variadas com NaOH para ajustar pH final 7,85. B) Cinética de superoxidação de AfPrxC por *t*-BOOH. As reações continham: 1 μ M de AfPrxC, tampão 1 \times (Tris 30 mM; MES 15 mM; ácido acético 15 mM; NaCl 120 mM; DTPA 0,05 mM pH 7,1), *t*-BOOH em concentrações variadas.

AfPrxC e CuOOH

A constante de segunda ordem de oxidação de AfPrxC por CuOOH foi determinada como $2,6 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, em pH 7,85 e 25 °C (Figura 24 A). Em concentrações baixas de CuOOH as constantes observadas da segunda fase da reação ($k_{\text{obs}2}$) aumentaram de maneira dependente da concentração de peróxido. Obtivemos k_2 de $6,1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, em pH 7,85 e 25 °C (Figura 24 B). Acreditamos que k_2 pode representar a constante de superoxidação de AfPrxC por CuOOH.

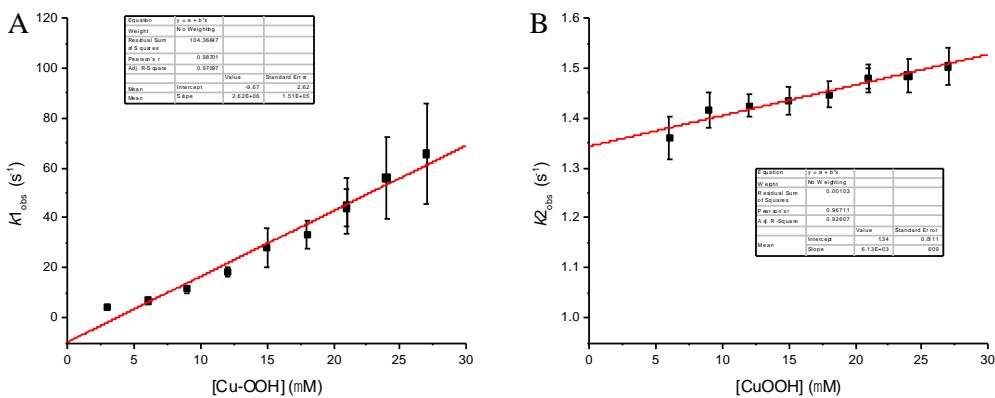


Figura 24 – Cinética da oxidação e superoxidação de AfPrxC por CuOOH. A) Cinética de oxidação de AfPrxC por CuOOH. As reações continham: 1 μ M de AfPrxC, tampão 1 \times (Tris 30 mM; MES 15 mM; ácido acético 15 mM; NaCl 120 mM; DTPA 0,05 mM pH 7,1), CuOOH em concentrações variadas com NaOH para ajustar pH final 7,85. C) Cinética de superoxidação de AfPrxC por CuOOH. As reações continham: 1 μ M de AfPrxC, tampão 1 \times (Tris 30 mM; MES 15 mM; ácido acético 15 mM; NaCl 120 mM; DTPA 0,05 mM pH 7,1), CuOOH em concentrações variadas com NaOH para ajustar pH final 7,8.

AfPrxC e LAOOH

Também foi possível calcular k_1 e k_2 da reação entre AfPrxC-S⁻ e LAOOH. Mesmo com concentrações baixas de LAOOH, sua reação com AfPrxC possui duas fases dependentes da concentração de peróxido. A constante k_1 da primeira fase reação (oxidação) foi calculada como sendo $2,6 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, em pH 7,85 e 25 °C (Figura 25 B) e a constante k_2 da segunda fase (provável superoxidação) como $6,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, em pH 7,85 e 25 °C (Figura 25 C). Importante ressaltar que foram avaliados três solventes para LAOOH: soluções contendo etanol 1 %, tween 20 1 % ou triton 100 1 %. A concentração dos solventes na reação final era de 0,5 %. Utilizar etanol 1 % como solvente de LAOOH foi a melhor opção já que, nas condições do ensaio, a presença de 0,5 % de etanol não alterou a atividade enzimática, bem como a fluorescência proteica (Figura 25 A).

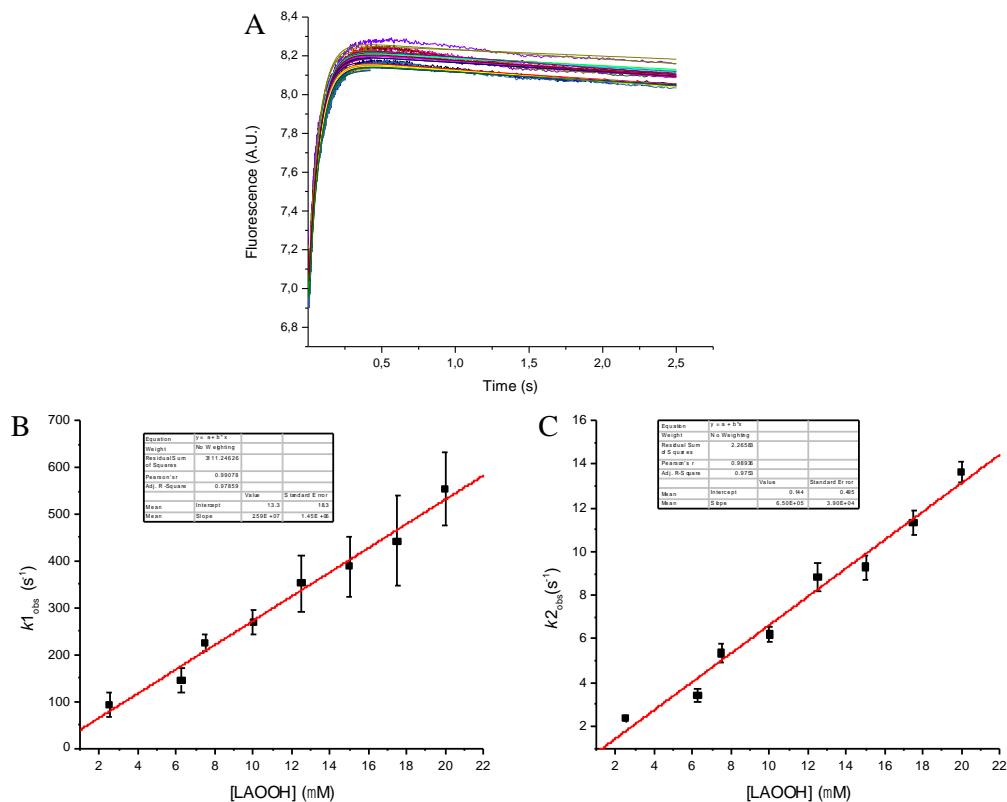


Figura 25 – Cinética da oxidação e superoxidação de AfPrxC por LAOOH. A) *Time course* da reação entre AfPrxC e LAOOH (20 μ M). B) Cinética de oxidação de AfPrxC por LAOOH. As reações continham: 1 μ M de AfPrxC, tampão 1 \times (Tris 30 mM; MES 15 mM; ácido acético 15 mM; NaCl 120 mM; DTPA 0,05 mM pH 7,1), LAOOH em concentrações variadas em 0,5 % etanol e com NaOH para ajustar pH final 7,8. C) Cinética de superoxidação de AfPrxC por H_2O_2 . As reações continham: 1 μ M de AfPrxC, tampão 1 \times (Tris 30 mM; MES 15 mM; ácido acético 15 mM; NaCl 120 mM; DTPA 0,05 mM pH 7,1), LAOOH em concentrações variadas em 0,5 % etanol e com NaOH para ajustar pH final 7,8.

AfPrxC e ONOO⁻

As curvas *time course* das reações entre AfPrxC e ONOO⁻ foram melhor ajustadas em equação exponencial tripla (Figura 26 A). De maneira curiosa, todas as fases das reações são dependentes da concentração de peróxido. Desta forma, foram obtidos k_1 ($5,74 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), k_2 ($1,94 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) e k_3 ($3,5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), em pH 6,5 e 25 °C (Figura 26). Acreditamos que k_1 represente a reação de oxidação de AfPrx1 por ONOO⁻, $1,1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

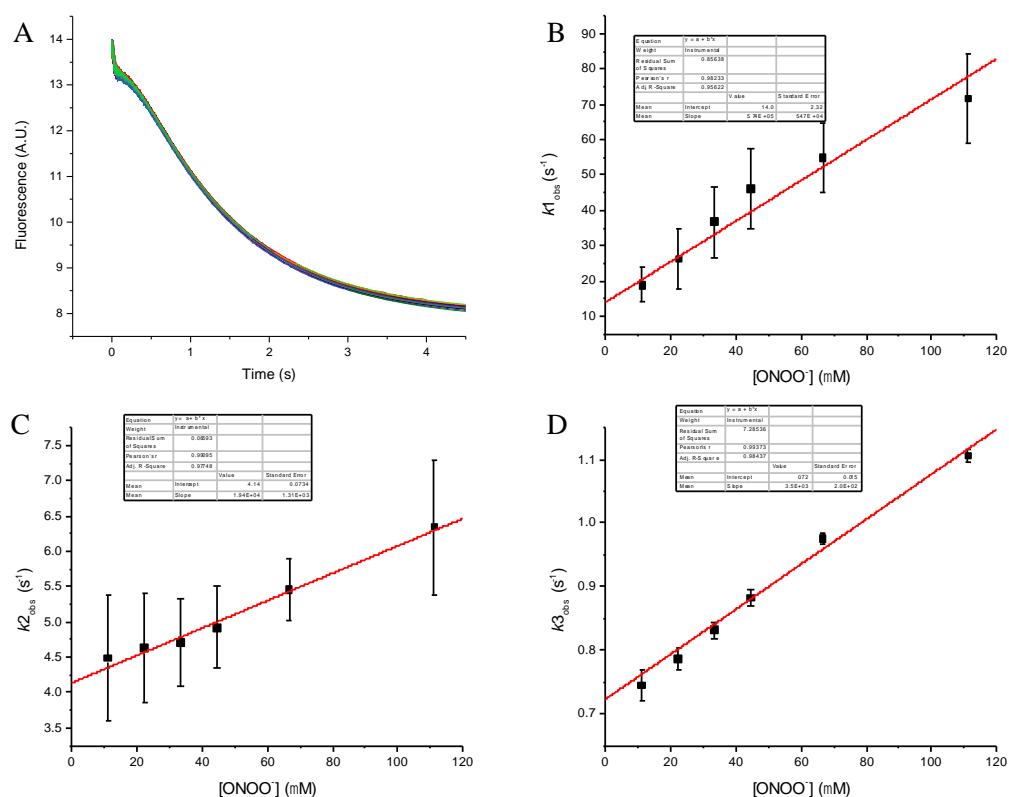


Figura 26 – Cinética da oxidação de AfPrxC por ONOO⁻. A) Perfil de curva *time course* ajusta a exponencial tripla. Todos os kobs foram dependentes da concentração de peróxido: $k_{1\text{obs}}$ (B); $k_{2\text{obs}}$ (C) e $k_{3\text{obs}}$ (D). As reações continham: 0,5 μ M de AfPrxC, tampão 50 mM de fosfato de sódio pH 6,0, ONOO⁻ em concentrações variadas em 2,5 mM NaOH (pH final 6,55).

Análise de especificidade entre AfPrx1 e AfPrxC frente a diferentes peróxidos

De acordo com os resultados obtidos, tanto AfPrx1 quanto AfPrxC são eficientes peroxidases (Tabela 4). Em relação ao H₂O₂, ambas apresentaram k na ordem de 10⁷ M⁻¹ s⁻¹, similar ao observado para outras Prx, incluindo Prx da mesma subfamília.^{25,51,54,77,110–114}

AfPrx1 se mostrou mais eficiente para a redução de H₂O₂ e ONOO[−], e progressivamente menos eficiente de acordo com o aumento da hidrofobicidade do hidroperóxido (*t*-BOOH → CuOOH → LAOOH). De maneira alternativa, AfPrxC apresentou alta reatividade com peróxidos orgânicos, com destaque para LAOOH. AfPrxC também se mostrou eficiente na redução de H₂O₂. Desta forma, apesar de AfPrx1 e AfPrxC apresentarem alta identidade de estrutura primária (71 % identidade e 82 % similaridade), a reatividade de AfPrxC para peróxidos orgânicos chega a ser três ordens de magnitude maior comparativamente com AfPrx1.

Ao analisar a superfície dos modelos estruturais de AfPrx1 e AfPrxC, é possível notar que no bolsão do sítio ativo, região em que a Cys_P encontra-se terminalmente posicionada, existem significativas diferenças na hidrofobicidade dos resíduos. Esta região em AfPrxC é mais hidrofóbica (regiões vermelhas) e poderia explicar sua alta reatividade por peróxidos orgânicos (Figura 27).

Tabela 4 – Resumo das constantes de oxidação (k_{oxi}) e superoxidação (k_{Soxi}) obtidas para AfPrx1 e Prx2 de *A. fumigatus* para os diferentes tipos de peróxido (M⁻¹ s⁻¹).

Proteína	H ₂ O ₂		<i>t</i> -BOOH		CuOOH		LAOOH		ONOO [−]	
	k_{oxi}	k_{Soxi}	k_{oxi}	k_{Soxi}	k_{oxi}	k_{Soxi}	k_{oxi}	k_{Soxi}	k_{oxi}	k_{Soxi}
AfPrx1	1.5×10^7	153.7	1.3×10^5	22	1.9×10^4	ND	7.7×10^4	ND	1.1×10^6	ND
AfPrxC	3.3×10^7	97	6.5×10^5	73,5	2.6×10^6	6.1×10^3	2.6×10^7	6.5×10^5	5.7×10^5	ND

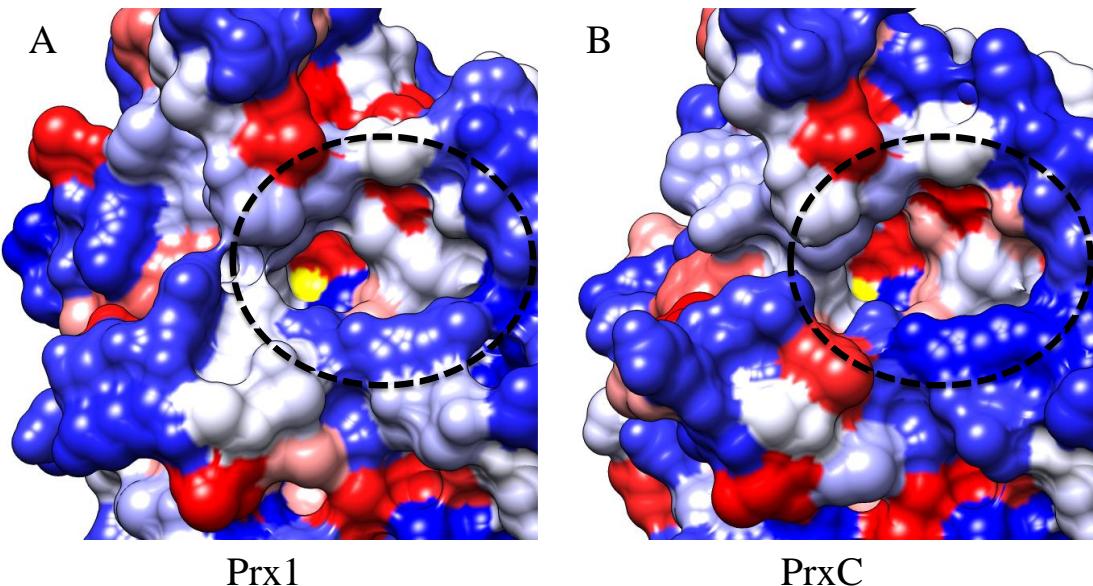


Figura 27 – Superfície hidrofóbica da região do sítio ativo em AfPrx1 (A) e AfPrxC (B). Os resíduos estão coloridos de acordo com a escala de Kyte e Doolittle (kdHydrophobicity), em que em azul escuro estão os resíduos mais hidrofílicos, passando por branco e em vermelho os resíduos mais hidrofóbicos. Os resíduos de Cys estão coloridos em amarelo. Imagens geradas pelo programa UCSF Chimera. Em destaque está a região do bolsão do sítio ativo.

O significado da segunda fase do perfil de fluorescência da oxidação das Prxs ainda não está claro. Em algumas situações a constante da segunda fase não depende da concentração de peróxidos; enquanto que em altos níveis desses oxidantes há dependência. Nestes casos, assumimos que estávamos analisando a reação de superoxidação e calculamos, portanto, a constante de segunda ordem de superoxidação (k_{Soxi}).

A presença desta segunda fase da reação já foi reportada para a proteína homóloga de *Plasmodium falciparum* (PfPrx6). Entretanto, os autores do trabalho não souberam interpretá-la já que a proteína não forma dímeros (Prx 1-Cys) e também não forma oligômeros¹¹⁶. Esta segunda fase de reação já foi descrita também em Prx de outra subfamília (AhpC/ Prx1), a Prx3 humana, que possui duas Cys envolvidas no ciclo catalítico (Prx 2-Cys). Para esta proteína, a segunda fase também é independente da concentração de peróxido quando este em baixas concentrações e dependente quando em altas concentrações (como ocorre para AfPrx1 e AfPrxC). Os autores discutem que esta fase da reação é complexa de analisar e poderia representar a formação do dissulfeto, alterações estruturais (de dodecâmero a dímero) ou mesmo a superoxidação da enzima¹¹⁷.

AfPrx1 apresentou $k_{\text{Soxi}} = 153,7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ com H₂O₂. Para as proteínas Prx2 e Prx3 de *H. sapiens*, as constantes calculadas de superoxidação foram $k = 12000 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, aproximadamente 100 × maior que para AfPrx1 estudada nesse trabalho¹¹⁸. Já a proteína AhpE de *M. tuberculosis* possui constante de superoxidação por H₂O₂ de $k = 40 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, aproximadamente 4 × menor do que a calculada para AfPrx1¹¹⁰. As variações de susceptibilidades à superoxidação entre estas Prx podem ser, pelo menos parcialmente, explicadas pelas particularidades das subfamílias que fazem parte.

Prx2 e Prx3 pertencem a subfamília AhpC/ Prx1, apresentando mecanismo 2-Cys Prx, com formação de dissulfeto intermolecular. Nesta subfamília, existem Prx sensíveis e Prx robustas à superoxidação. As Prx sensíveis possuem os motivos GGLG e YF que estão relacionados com o atraso da formação do dissulfeto (entre a Cys_P-SOH e Cys_R-SH) e consequente maior susceptibilidade de superoxidação da Cys_P. Desta forma, é esperado que as proteínas Prx2 e Prx3 tenham constantes de superoxidação mais altas¹¹⁹. Esta susceptibilidade maior à superoxidação parece estar relacionada com sinalização celular e atividade de chaperona e representaria um ganho evolutivo¹²⁰.

A enzima AhpE, por sua vez, faz parte da subfamília AhpE que está relacionada com maior eficiência para redução de peróxidos orgânicos do que para redução de H₂O₂. Desta forma, a baixa constante de superoxidação pode ser reflexo da atividade peroxidásica mais discreta com H₂O₂¹²¹.

Para os peróxidos orgânicos, AfPrxC apresentou maior susceptibilidade à superoxidação que AfPrx1. Esta característica pode estar associada a maior reatividade de AfPrxC com estes peróxidos. Fato semelhante ocorre com AhpE que possui alta reatividade com peróxidos orgânicos e que sua constante de superoxidação com LAOOH é na ordem de 10^5 ¹¹⁰.

Medidas eletroquímicas *in vivo* para estudo da degradação de H₂O₂ por AfPrx1

As determinações eletroquímicas de H₂O₂ foram realizados em colaboração com a equipe do Prof. Dr Mauro Bertotti (IQ – USP), mais especificamente com Ms. Carla Santana Santos e Dr. Alex S. Lima. Os resultados estão descritos em artigo intitulado “*Monitoring H₂O inside Aspergillus fumigatus with an integrated*

microelectrode: the role of peroxiredoxin protein PrxI” publicado no periódico *Analytical Chemistry* (Anexo II)⁸².

Como dito na introdução, Prxs são enzimas importantes na detoxificação de hidroperóxidos, como o H₂O₂. Em patógenos, esta detoxificação pode muitas vezes resultar em sua maior sobrevivência e virulência no hospedeiro já que este libera oxidantes como forma de defesa. De fato, recentemente foi descrito que uma 2-Cys Prx atípica de *A. fumigatus* (Asp f3) é importante para a sua sobrevivência frente H₂O₂ e *t*-BOOH e para a sua virulência em modelo de camundongo neutropênico¹²². Adicionalmente, investigamos em colaboração com o grupo do Prof. Dr. Iran Malavazi (UFSCar) (Anexo I) o papel das três Prx6 de *A. fumigatus* nas respostas desse fungo frente a diferentes tipos de estresse e na sua virulência. Tanto nos dados *in vitro* quanto *in vivo*, a linhagem $\Delta Afprx1$ mostrou-se mais sensível, indicando um papel importante de AfPrx1 no organismo. Além disso, mostramos que a linhagem $\Delta Afprx1$ é menos virulenta que a selvagem¹¹⁵.

Assim, gostaríamos de medir de forma direta o consumo de H₂O₂ na linhagem $\Delta Afprx1$ em comparação com a wt e $\Delta Afprx1::\Delta Afprx1^+$ (linhagem controle, em que o gene *AfPrx1* foi reintroduzido). Para isso, utilizamos um microeletrodo específico para H₂O₂ desenvolvido pelo grupo do Dr. Mauro Bertotti (IQ-USP), capaz de ser inserido no microambiente do fungo (aglomerado de micélio). Com o auxílio de um micromanipulador, o microeletrodo foi inserido com acurácia e lentamente no centro do micélio de *A. fumigatus*, localizado em meio de cultura (Figura 28 A). A fim de verificar se o microeletrodo realmente estava inserido no microambiente do fungo, os perfis dos voltamogramas de antes e depois da inserção foram analisados. Como os níveis de O₂ em tecidos biológicos é menor em resposta aos sistemas bioenergéticos como a mitocôndria, a corrente gerada quando o microeletrodo está inserido no fungo também é menor (Figura 28 B).

A concentração de H₂O₂ adicionado exogenamente pode ser acompanhada ao longo do tempo através das medidas com correntes de 0,8 V para as linhagens wt (Figura 28 A), $\Delta Afprx1$ (Figura 28 B) e $\Delta Afprx1::\Delta Afprx1^+$ (Figura 28 C). Após a primeira adição de H₂O₂, os valores de corrente se mantiveram constantes (primeira seta, CF = 1 mM). Com a segunda adição de H₂O₂ (segunda seta, CF = 1,96 mM), um pequeno aumento na corrente pode ser verificado para as linhagens wt e $\Delta Afprx1::\Delta Afprx1^+$. Acreditamos que este aumento é consequência do transporte do H₂O₂

exógeno para dentro do microambiente fúngico e para a superfície eletroquímica. O posterior declínio da corrente observado pode estar relacionado com mecanismos enzimáticos e não enzimáticos de degradação do peróxido. Por fim, a terceira alíquota de H₂O₂ foi adicionada (terceira seta CF = 3,85 mM) apenas nas linhagens wt e $\Delta Afprx1::\Delta Afprx1^+$ e um grande aumento na corrente pode ser verificado. Como a linhagem *knockout* $\Delta Afprx1$ já apresentou grande aumento de corrente após a segunda adição, a terceira adição não se fez necessária.

Foi possível observar que as linhagens wt e $\Delta Afprx1::\Delta Afprx1^+$ foram capazes de reestabelecer as concentrações basais de H₂O₂ após aproximadamente 10 min. Entretanto, o mutante $\Delta Afprx1$ não foi capaz de detoxificar o H₂O₂ mesmo após 50 min. Por fim, o microeletrodo era removido do fungo e os níveis de H₂O₂ exógenos foram medidos. Para as linhagens wt e $\Delta Afprx1::\Delta Afprx1^+$, as concentrações de peróxido eram muito maiores do que as medidas no microambiente do fungo, onde diversos sistemas antioxidantes estão ativos. Já para a linhagem $\Delta Afprx1$, as concentrações dentro e fora do microambiente fúngico foram similares. Estes resultados sugerem que AfPrx1 é a principal enzima responsável pela redução do H₂O₂ exógeno em *A. fumigatus*.

Utilizando o gráfico de calibração, foi possível determinar as concentrações de peróxido ao final dos experimentos, tanto dentro do microambiente do fungo como fora (Figura 29). Após análises estatísticas (*two-way* ANOVA, n = 4), é possível concluir que a linhagem wt decompôs 71 ± 7 % do H₂O₂, valor significativamente diferente da linhagem *knockout*, que decompôs 8 ± 3 %.

Apesar da maioria dos organismos aeróbicos possuírem diversos mecanismos para remoção de H₂O₂, fatores como compartmentalização, abundância, afinidade pelo substrato (K_m) e turnover (k_{cat}) podem determinar a importância de determinada enzima para degradar H₂O₂¹²³. AfPrx1 é uma proteína abundante, altamente reativa com H₂O₂ e citossólica¹¹⁵. Estas características podem explicar a importância desta enzima para a decomposição de H₂O₂ em *A. fumigatus*.

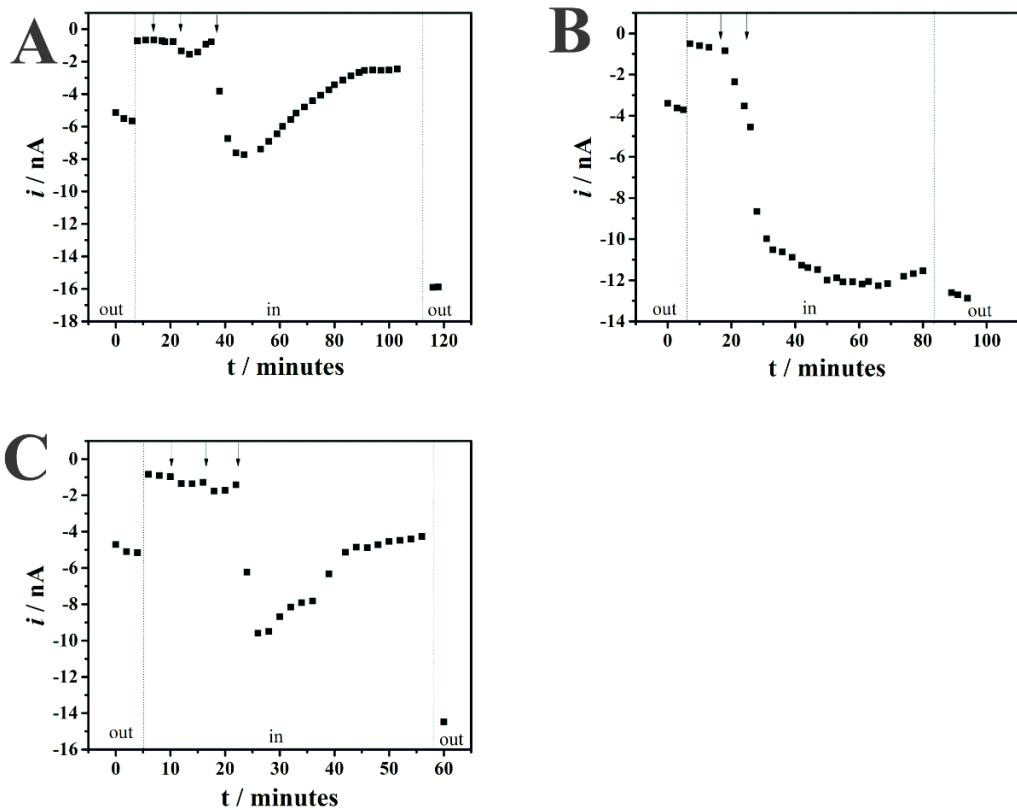


Figura 28 – Valores de corrente medidos a -800 mV dos voltamogramas obtidos utilizando o microeletrodo inserido em *mycelium clumps* de *A. fumigatus* em 10 mL de MM utilizando linhagem wt (A), mutante $\Delta Aprx1$ (B) e $\Delta Aprx1::\Delta Aprx1^+$ (C) em função do tempo. Setas indicam as adições de H_2O_2 : primeira seta $C_F = 1$ mM; segunda seta $C_F = 1,96$ mM e terceira seta $C_F = 3,85$ mM.

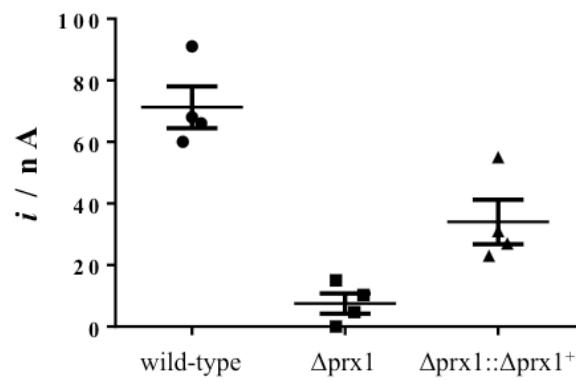


Figura 29 – Eficiência da degradação de H_2O_2 (%) para cada linhagem. N= 4. Tw0-way ANOVA com diferença significativa $p < 0,05$. Teste *a posteriori* Dunn comparação múltipla: wt vs $\Delta Aprx1$, $p = 0,0051$; wild-type vs $\Delta Aprx1::\Delta Aprx1^+$, $p = 0,3502$; $\Delta Aprx1$ vs $\Delta Aprx1::\Delta Aprx1^+$, $p = 0,3502$.

Avaliação da sobrevivência de *A. fumigatus* após estresse oxidativo e inserção do eletrodo

Após verificarmos que a enzima AfPrx1 é fundamental para a detoxificação do H₂O₂ em *A. fumigatus* e que o fungo Δ Afprx1 não consegue restaurar os níveis basais de peróxido, foi questionado se esta linhagem estaria viável após os tratamentos. Adicionalmente, testou-se a influência da inserção do eletrodo nos micélios na viabilidade dos mesmos.

Primeiramente, os fungos foram submetidos ao mesmo protocolo para determinação de H₂O₂. Posteriormente, eles foram lavados em meio sem peróxido e alocados em placas individuais de meio completo sólido. É possível verificar que as linhagens se desenvolveram de maneira similar, independente da presença do eletrodo ou do tratamento com H₂O₂ (Figura 30) (Tabela 5).

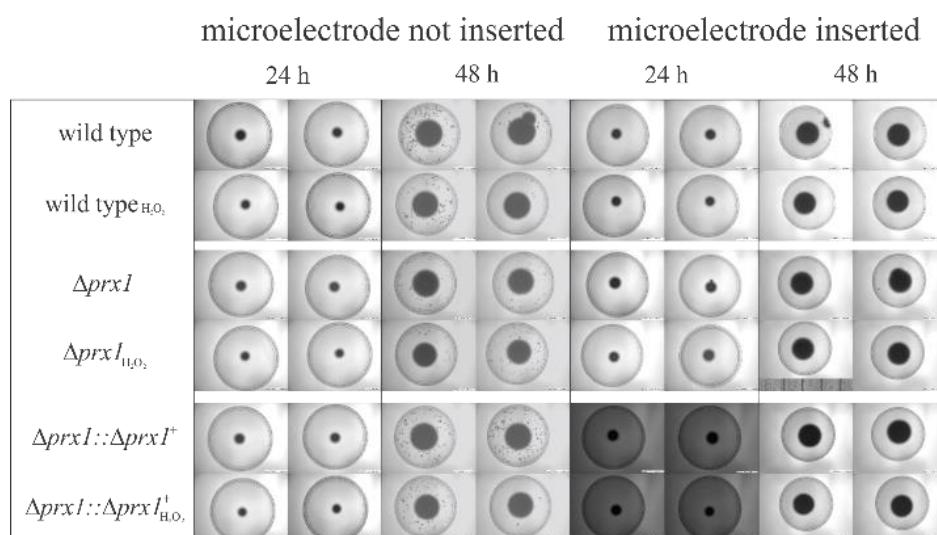


Figura 30 – Resultado do crescimento de micélio em meio sólido após 24 e 48 horas (37 °C). Cada fungo foi submetido ao tratamento com H₂O₂ e os experimentos foram feitos tanto na presença da inserção do microeletrodo quanto na ausência. N = 4.

Tabela 5 – Diâmetros das colônias (cm) após 48 h de crescimento a 37 °C em placas meio YG sólido após diferentes tratamentos.

strains	diameter of the colony (cm)			
	not exposed to H ₂ O ₂		exposed to H ₂ O ₂	
	microelectrode		microelectrode	
	inserted	not inserted	inserted	not inserted
wild-type	4.2 ± 0.1	4.3 ± 0.3	4.1 ± 0.1	4.1 ± 0.1
Δprx1	4.3 ± 0.1	4.1 ± 0.1	4.1 ± 0.1	3.9 ± 0.1
Δprx1::Δprx1 ⁺	4.5 ± 0.2	4.3 ± 0.1	4.1 ± 0.1	4.1 ± 0.1

Ao medir a atividade metabólica dos fungos utilizando o reagente alamarBlue, conclusões similares foram obtidas: não houve diferenças na viabilidade das linhagens, independentemente da presença do eletrodo ou do tratamento com H₂O₂ (Figura 31 A). Entretanto, uma observação interessante é que apenas a linhagem $\Delta Afprx1$ não apresentou conídeos (pontos escuros) após 48 h de incubação, indicando um atraso no desenvolvimento destas estruturas (Figura 31 B) Este atraso também foi independente da inserção do eletrodo ou tratamento com H₂O₂.

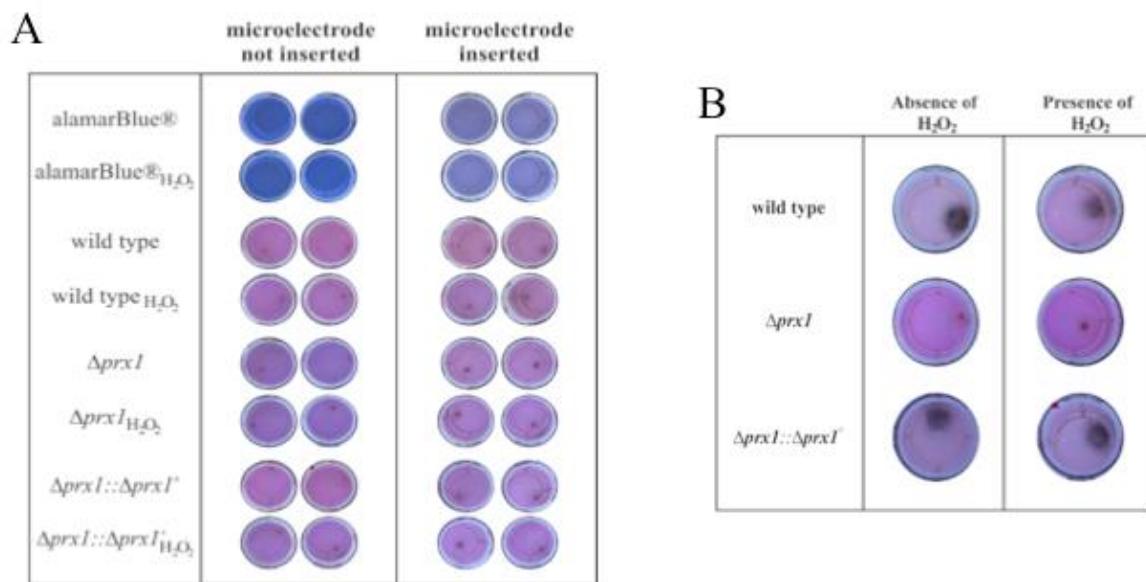


Figura 31 – A) Imagens dos poços contendo um micélio após 24 horas de incubação a 37 °C. Os diretentes tratamentos estão descritos na imagem. N=4. B) Imagines representativas dos poços contendo um micélio após 48 horas de incubação a 37 °C. N = 4. Os diferentes tratamentos estão descritos na imagem.

Desta forma, é possível concluir que apesar do mutante $\Delta Afprx1$ ter sua capacidade de remoção de H₂O₂ extremamente comprometida, esta linhagem mantém-se viável e não tem seu crescimento comprometido, mesmo quando submetida a estresse oxidativo e mesmo após a inserção do microeletrodo. Assim, a incapacidade do fungo de decompor H₂O₂ se deve a falta da enzima AfPrx1 e não à morte do organismo.

Avaliação da virulência das diferentes linhagens de *A. fumigatus* em macrófagos (J774)

As infecções ocasionadas por *A. fumigatus* são provocadas pela inalação dos conídios, que atingem os pulmões do hospedeiro. Estes conídios possuem diâmetro

pequeno o suficiente (2 a 3 μm) para atingir os alvéolos pulmonares^{60,61}. A população residente de macrófagos alveolares é a primeira linha de defesa imune a interagir com *A. fumigatus* no pulmão⁶². Quanto menor for a sobrevivência destes conídios após a interação com macrófagos alveolares, mais facilmente este fungo será eliminado do hospedeiro¹²⁴. Desta forma, investigamos se as três 1-Cys Prx de *A. fumigatus* pertencentes a subfamília Prx6 teriam importância neste processo de defesa e sobrevivência do fungo.

As linhagens utilizadas para o experimento foram: wt, $\Delta Afp_{rx}1$, $\Delta Afp_{rx}B$, $\Delta Afp_{rx}C$, $\Delta Afp_{rx}1::\Delta Afp_{rx}1^+$, $\Delta Afp_{rx}B::\Delta Afp_{rx}B^+$ e $\Delta Afp_{rx}C::\Delta Afp_{rx}C^+$, $\Delta Afp_{rx}B \Delta Afp_{rx}C$. Os conídeos destas linhagens e os macrófagos J774 interagiram numa proporção 2:1 por 6 horas. A partir da contagem das UFCs, foi possível perceber que todas as linhagens nocauteadas apresentaram menor sobrevivência em comparação com a linhagem selvagem, sendo a diferença significativa para todas as linhagens: $\Delta Afp_{rx}1$ p = 0,0009; $\Delta Afp_{rx}B$ p = 0,001; $\Delta Afp_{rx}C$ p = 0,0004; $\Delta Afp_{rx}B \Delta Afp_{rx}C$ p = 0,0001. Adicionalmente, as linhagens complementantes não apresentaram diferenças significativas em relação à selvagem, assim, o fenótipo selvagem foi restaurado (Figura 32).

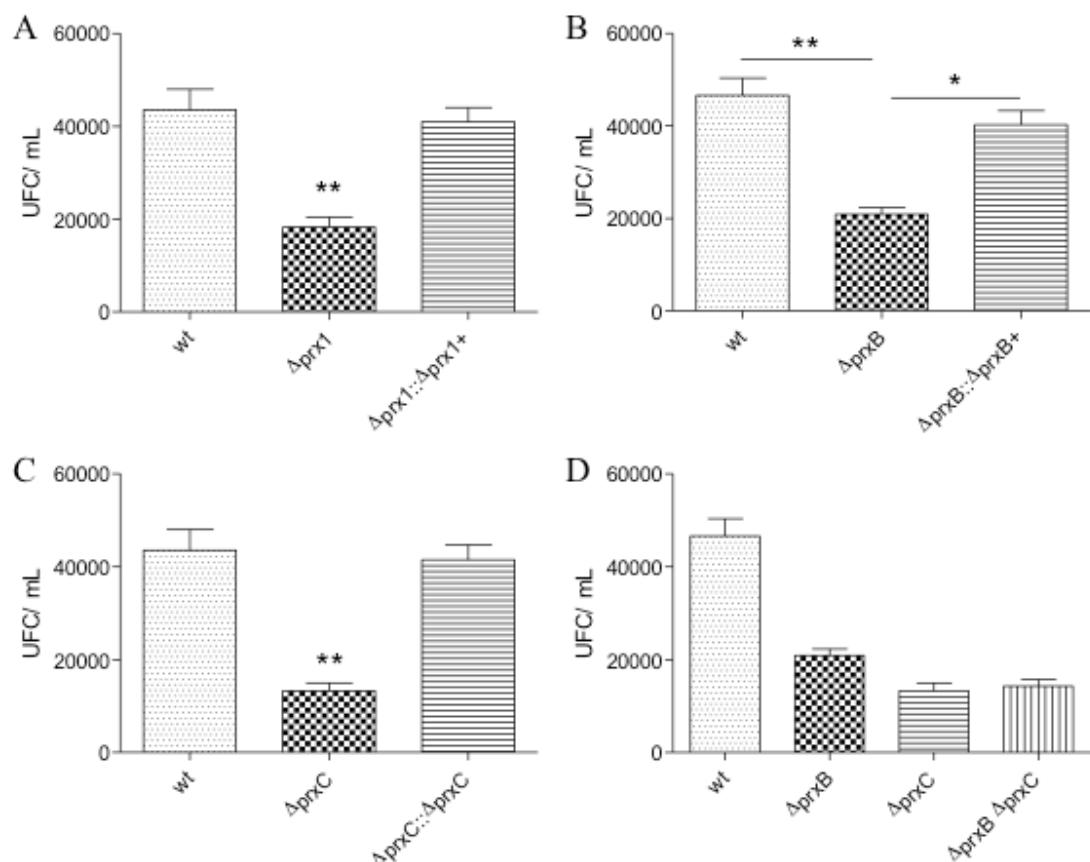


Figura 32 – Unidades formadoras de colônia (UFC) após 6 horas de interação entre conídios e macrófagos J774. Macrófagos J774 (2×10^5) e conídios de *A. fumigatus* (4×10^5) foram incubados em atmosfera de 5 % CO₂ 37 °C por 6 h em 1 mL de meio RPMI com 10 % de soro fetal bovino. Após este período, os macrófagos foram lisados com água Milli-Q estéril (1 mL), as soluções foram diluídas 1000 × e plaqueadas em meio complete YAG. As UFC foram contadas após incubação das placas (37 °C por 24 h) e foram estatisticamente diferentes entre a linhagem wt e knockout e as linhagens complementantes restauraram o fenótipo selvagem. A) Comparação entre wt, $\Delta Afprx1$, and $\Delta Afprx1::\Delta Afprx1^+$ (Kruskal-Wallis, p = 0,0009), B) Comparação entre wt, $\Delta AfprxB$ e $\Delta AfprxB::\Delta AfprxB^+$ (Kruskal-Wallis, p = 0,001), C) Comparação entre wt, $\Delta AfprxC$ e $\Delta AfprxC::\Delta AfprxC^+$ (Kruskal-Wallis, p = 0,0004), e D) É possível notar que o duplo mutante $\Delta AfprxB \Delta AfprxC$ possui o mesmo fenótipo que $\Delta AfprxC$ (sem efeito cumulativo).

Buscamos quantificar a citocina pró-inflamatória TNF- α liberadas pelos macrófagos após a interação com o fungo, entretanto, nenhum sinal foi obtido. Uma possível explicação para isso seria que o tempo de interação não foi suficiente para produções significativas de citocinas. *A. fumigatus* é um fungo ubíquo e seus conídios são constantemente inalados, aproximadamente algumas centenas por dia por pessoa. Desta forma, macrófagos alveolares não desencadeiam a resposta pró-inflamatória quando interagem com os conídeos (*resting state*) e isto evita inflamação crônica. Para que as citocinas pró-inflamatórias sejam liberadas pelos macrófagos, eles devem interagir com as formas mais maduras do fungo, quando os conídios germinam (*germ tube*) e originam as hifas¹²⁵.

Estes resultados obtidos com macrófago de linhagem J774 foram realizados antes do período do BEPE (Processo 2016/12248-5). Consideramos estes resultados bastante interessantes e questionamos se eles seriam semelhantes se utilizássemos macrófagos alveolares, num modelo mais fiel à infecção por *A. fumigatus*. No laboratório do Prof. Dr. Aron B. Fisher, tive acesso a camundongos C57Bl/6 wt e auxiliei o Dr. Jose Vazquez-Medina no isolamento dos macrófagos alveolares. De maneira geral, os resultados com células primárias reproduziram os resultados obtidos com macrófagos de linhagem J774: as linhagens nocauteadas sobreviveram significativamente menos após interação com macrófagos se comparadas com wt e complementantes e não foi possível detectar a liberação de TNF- α . Desta forma, acreditamos que a atividade das Prx auxilia de maneira significativa a sobrevivência dos conídios de *A. fumigatus* durante o processo de fagocitose por macrófagos.

Parte II – Identificação e caracterização de agentes redutores das Prx6 de *A. fumigatus*

Materiais e Métodos

Sistema Trx

Identificação, clonagem e purificação do sistema Trx de *A. fumigatus*

A busca das sequências de tiorredoxinas (Trx) e tiorredoxina redutase (TrxR) foram feitas através dos softwares BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) utilizando como molde as sequências homólogas de *S. cerevisiae* (Tabela 6). Então, os oligonucleotídeos foram desenhados a partir da sequencia genômica de *A. fumigatus* e sequências adaptadoras para as enzimas de restrição adequadas foram inseridas a fim de facilitar a clonagem direcional. As sequências dos oligonucleotídeos estão descritas na Tabela 7.

Tabela 6 – ORFs de *A. fumigatus* que potencialmente codificam tiorredoxinas e tiorredoxina redutase.

Locus tag	NCBI Reference Sequence	Nome proteína
AFUA_3G14970	XM_749034.1	Trx3g
AFUA_5G11320	XM_748424.1	Trx5g
AFUA_6G10300	XM_745825.1	Trx6g
AFUA_8G01090	XM_742004.1	Trx8g
AFUA_4G12990	XM_746439.1	TrxR

Tabela 7– Oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos genes *trx3g*, *trx5g*, *trx6g*, *trx8g*, *trxr*.

Nome	Sequência	Enzima de restrição
Trx3g_F	5' CGGATCCC <u>CATATGGCGTCGAAGAACTA</u> 3'	<i>NdeI</i>
Trx3g_R	5' CAAGCTT <u>GGATC</u> TTACCCCTGGACACT 3'	<i>BamHI</i>
Trx5g_F	5' CGGATCCC <u>CATATGTCTCACAACGTCGAG</u> 3'	<i>NdeI</i>
Trx5g_R	5' CAAGCTT <u>GGATCC</u> TAAGCAACGTGCGC 3'	<i>BamHI</i>
Trx6g_F	5' CGGATCCC <u>CATATGATGTCCCATGGCAA</u> 3'	<i>NdeI</i>
Trx6g_R	5' CAAGCTT <u>GGATC</u> TTAAGCAGAAACT 3'	<i>BamHI</i>

Trx8g_F	5' CGGATCCC <u><u>CATATGCCTGTTACCGAGATC</u></u> 3'	<i>NdeI</i>
Trx8g_R	5' CAAGCTT <u><u>GGATCC</u></u> CCTATAGAGAGCGTGC 3'	<i>BamHI</i>
TrxR_F	5' CGGAT <u><u>CCC</u></u> CATATGGTGACACAAAAGTT 3'	<i>NdeI</i>
AfTrxR_R	5' CAAGCTT <u><u>AAGCTT</u></u> TAGAGAAGAGGGTT 3'	<i>HindIII</i>

As clonagens das quatro Trx e da única TrxR identificada de *A. fumigatus* foram realizadas a partir da amplificação do cDNA do fungo com *primers* da Tabela 7. As condições das PCRs foram padronizadas e estão descritas na Tabela 8 e Tabela 9. Os genes amplificados, bem como o plasmídeo pET3a para as Trx e pET28a para TrxR, foram digeridos com as enzimas de restrição *BamHI* ou *HindIII* e *NdeI* para posterior ligação. A ligação foi conferida por digestão, PCR de colônia e sequenciamento.

Tabela 8 – Descrição dos reagentes e as quantidades que foram utilizadas nas reações de PCR a fim de realizar a amplificação dos genes do sistema Trx de *A. fumigatus*.

		Volume (μl)				
		<i>trx3g</i>	<i>trx5g</i>	<i>trx6g</i>	<i>trx8g</i>	<i>trxR</i>
Reagentes						
10× Tampão	-	2	-----	-----	-----	-----
Mg ⁺²						
5× Tampão CG		-----	4	4	4	4
DNTP 2,5 mM		1	1	1	1	1
MgCl ₂ 50 mM		0,6	-----	-----	-----	-----
PrimerF	15 pmol/μl	1	1	1	1	0,5
PrimerR	15 pmol/μl	1	1	1	1	0,5
cDNA		1	1	1	1	1
TaqDNA pol.		0,2	-----	-----	-----	-----
Phusion HF		-----	0,2	0,2	0,2	0,2
DMSO 10%		-----	0,6	0,6	0,6	0,6
Água		13,2	11,2	11,2	11,2	12,2

Tabela 9 – Descrição dos ciclos das reações de PCR para cada um dos componentes do sistema Trx de *A. fumigatus*.

	Denaturação inicial	Denaturação	Anelamento	Extensão	Extensão final
<i>trx3g</i>	94°C/ 03:00 1×	94°C/ 00:45	65°C/ 00:30 35×	72°C/ 01:30	72°C/ 10:00 1×
<i>trx5g</i>	98°C/ 03:00 1×	98°C/ 00:45	60°C/ 00:30 35×	72°C/ 01:30	72°C/ 10:00 1×
<i>trx6g</i>	94°C/ 03:00 1×	94°C/ 00:45	60°C/ 00:30 35×	72°C/ 01:30	72°C/ 10:00 1×

<i>trx8g</i>	94°C/ 03:00 1×	94°C/ 00:45 35×	60°C/ 00:30 1×	72°C/ 01:30 1×	72°C/ 10:00 1×
<i>trxR</i>	94°C/ 03:00 1×	94°C/ 00:10 35×	55°C/ 00:30 72°C/ 00:40 72°C/ 10:00 1×	72°C/ 00:40 1×	72°C/ 10:00 1×

A linhagem de *E. coli* BL21 (DE3) foi utilizada nas transformações com os plasmídeos construídos. As condições de crescimento e indução foram: pré-inóculo 50 mL de LB + antibiótico (100 µg/ mL de ampicilina para as Trx e 50 µg/ mL de kanamicina para a TrxR) inoculado com colônia da placa de transformação crescido a 37 °C/ 250 rpm/ overnight. Inóculo 1 L LB + antibiótico (100 µg/ mL de ampicilina para as Trx e 50 µg/ mL de kanamicina para a TrxR) inoculado a partir do pré-inóculo para OD inicial 0,15 e crescido a 37 °C/ 250 rpm até atingir OD 0,6-0,8. A indução realizada com IPTG 0,3 mM a 37 °C/ 250 rpm/ 3h.

Após a indução, as células foram decantadas por meio de centrifugação 10 min/ 4°C/ 5000 rpm e ressuspendidas em: tampão 1 (Tris-Cl 20 mM pH 7,4; 400 µl de PMSF 0,05 M; DTPA 100 µM) para as Trx e tampão 2 (fosfato de sódio 20 mM pH 7,4; NaCl 100 mM e imidazol 10 mM) para TrxR. O rompimento das células foi realizado por sonicação (35% amplitude, 5 minutos) e os ácidos nucléicos foram removidos por meio de tratamento com sulfato de estreptomicina (concentração final = 1 %) por 15 minutos. Após este período, os extratos foram centrifugado por 45 min/ 4°C/ 15000 rpm, o precipitado descartado e os extratos proteicos livres de ácidos nucléicos coletados.

A proteína TrxR foi purificada por IMAC em colunas HisTrap FF (GE Healthcare) ou Ni-NTA Superflow (Qiagen) em gradiente de imidazol em AKTA (GE Healthcare). A qualidade da purificação da proteína foi constatada por SDS-PAGE em condições redutoras. Após estes procedimentos, a proteína foi dessalinizada através de cromatografia de filtração em gel utilizando a coluna PD10 (GE Healthcare) e concentradas por centrifugação (5000 rpm/ 4 °C) utilizando concentradores Ultracel YM-30 (Millipore) até concentração final desejada.

As tiorredoxinas (Trx3g, Trx5g, Trx6g, Trx8g) são proteínas termoestáveis e, desta forma, foram purificadas por fervura: DTT 100 mM foi adicionado e posteriormente a mistura foi fervida por 45 minutos a 100 °C; centrifugada por 10 min/ 15000 rpm/ 4°C; e o sobrenadante foi recuperado. Para garantir a pureza das proteínas, elas foram submetidas à cromatografia líquida (FPLC) com coluna de troca

aniônica (MonoQ® HR10/10, COD Nº17-0556-01, PHARMACIA BIOTECH): tampão A: Tris-Cl 20 mM pH 7,4 e tampão B: Tris-Cl 20 mM pH 7,4 e NaCl 1 M. Protocolo: 8 volumes de coluna (VC) do tampão A; amostra; 10 VC 0 – 50% de tampão B; 5 VC 50 – 100% de tampão B; 5 VC 100% de tampão B. Os picos de proteína foram analisados por SDS-PAGE redutor para verificar a pureza da amostra. As amostras com alto grau de pureza foram concentradas por centrifugação (5000 rpm/ 4 °C) utilizando concentradores Ultracel YM-3 (Millipore) até concentração final desejada.

Quantificação de proteínas

Os coeficientes de extinção das proteínas do sistema Trx ($\lambda = 280$ nm) estão descritos na Tabela 10. As proteínas purificadas foram quantificadas através do coeficiente de extinção obtido no site <http://www.expasy.org/tools/protparam>, com exceção de TrxR. Para esta proteína, foi necessária a obtenção do coeficiente de extinção a partir do coeficiente de extinção da flavina segundo o protocolo ¹²⁶:

1. Usar de 0,5 a 1 mg da flavoproteína (no caso a TrxR) diluído em 900 μ L.
2. Obter o espectro de absorção (650 – 300 nm) e anotar a absorbância máxima (~ 450 nm) (leitura 1).
3. Transferir amostra para tubo com 100 μ L de TCA 50%, centrifugar por 2 min a 12000 rpm.
4. Ajustar o pH para o pH inicial com carbonato de sódio sólido.
5. Obter novamente o espectro de absorção (650 – 300 nm) e anotar a absorbância máxima (~ 450 nm) (leitura 2).
6. Determinar o ϵ a partir da seguinte fórmula:

$$\epsilon_{\text{TrxR}} = \epsilon_{\text{FAD}} \times \text{leitura 1} / \text{leitura 2}$$

Tabela 10 – Relação dos coeficientes de extinção das proteínas do sistema Trx. A TrxR foi a única proteína em que o ϵ foi determinado a partir do método da flavina. Os demais ϵ foram obtidos a partir do software Protparam.

Proteína	Coeficiente de extinção ($M^{-1} cm^{-1}$)	Peso molecular (Da)
Trx3g (Afu3g14970)	13075 _{OXI} / 12950 _{RED}	11936,7
Trx5g (Afu5g11320)	7115 _{OXI} / 6990 _{RED}	11975,7
Trx6g (Afu6g10300)	10095 _{OXI} / 9970 _{RED}	11913,8
Trx8g (Afu8g01090)	15595 _{OXI} / 15470 _{RED}	12856,6
TrxR (Afu4g12990)	9859,25 (flavina)	44353,3

Ensaio de redução do DTNB

O ensaio de redução do DTNB foi realizado a fim de verificar se as Trx e a TrxR de *A. fumigatus* estavam ativas e interagindo. Este ensaio foi realizado segundo Oliveira *et al.*, 2010¹²⁷. Neste ensaio, o dissulfeto da molécula artificial DTNB é reduzido pela Trx, que torna-se oxidada, por sua vez é reduzida pela TrxR, que recebe elétrons do NADPH. Uma vez que apenas o TNB absorve a 412 nm, podemos acompanhar espectrofotometricamente sua formação se o sistema completo estiver funcionando (Figura 33). A partir da velocidade da reação com as diferentes concentrações de Trx, pudemos construir o gráfico de velocidade \times [Trx] e determinar os parâmetros cinéticos aparentes das reduções das Trx pela TrxR utilizando a regressão não-linear de Michaelis-Menten.

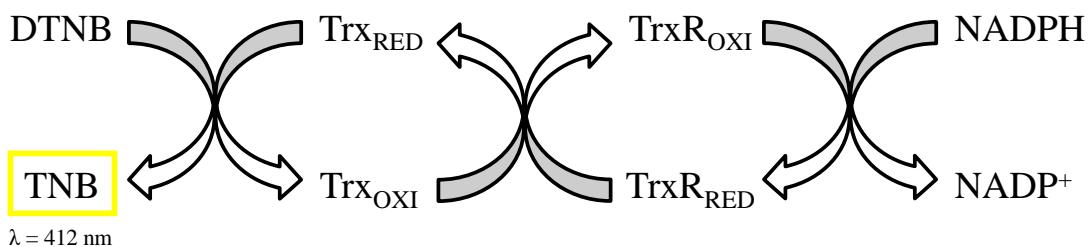


Figura 33 – Esquema simplificado das reações REDOX presentes no ensaio de redução do DTNB. DTNB é reduzido a TNB pela Trx, que se torna oxidada; Trx oxidada é reduzida pela TrxR, que se torna oxidada e recebe elétrons do NADPH. Neste ensaio, acompanha-se espectrofotometricamente ($\lambda = 412$ nm) a produção de TNB.

Ensaio acoplado com o sistema Trx

O ensaio de oxidação do NADPH foi realizado a fim de verificar se o sistema Trx de *A. fumigatus* é capaz de reduzir as proteínas AfPrx1 e AfPrxC. Este ensaio foi realizado segundo Munhoz e Netto, 2004¹²⁸¹²⁹. Cada reação continha TrxR 0,1 μM; Trx 0-40 μM; Prx 1 μM; HEPES 50 mM pH 7,4; NADPH 250 μM e H₂O₂ 500 μM. As Trx usadas nos experimentos foram: Trx3g; Trx5g; Trx6g e Trx8g. As reações foram iniciadas com a adição de H₂O₂ e o consumo de NADPH foi acompanhado espectrofotometricamente ($\lambda = 340$ nm). Os experimentos em que foi adicionada GSH ao sistema foram realizados de acordo com previamente descrito por Pedrajas *et al.*, 2016¹³⁰.

Neste ensaio, o H₂O₂ é reduzido pela Prx, que fica oxidada. Caso a Trx seja um agente redutor da Prx, ela reduzirá a Prx e será reduzida pela TrxR. A TrxR, por sua vez, é reduzida ao receber elétrons do NADPH, que se oxida a NADP⁺ (Figura

34). Como o NADPH absorve a 340 nm e o NADP⁺ não absorve, o acompanhamento das reações em cadeia é monitorado pelo decaimento da absorbância a 340 nm, ou seja, pelo consumo de NADPH.

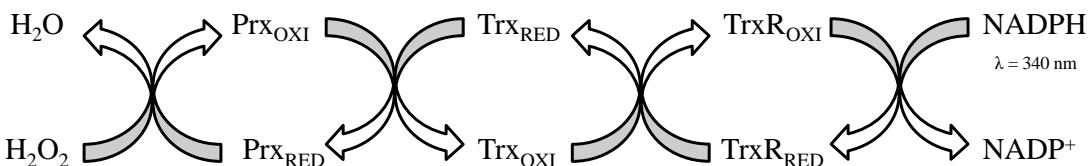


Figura 34 - Esquema simplificado das reações REDOX presentes no ensaio de oxidação de NADPH. H₂O₂ é reduzido a H₂O pela Prx, que se torna oxidada; Prx oxidada é reduzida pela Trx, que se torna oxidada; Trx oxidada é reduzida pela TrxR, que se torna oxidada e recebe elétrons do NADPH, que se torna oxidado (NADP⁺). Neste ensaio, acompanha-se espectrofotometricamente o consumo de NADPH.

Sistema Grx

Identificação, síntese gênica e purificação do sistema Grx de *A. fumigatus*

A busca das sequências de glutarredoxinas (Grx) foi realizada através dos softwares BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) utilizando como molde as sequências homólogas de *S. cerevisiae*, tanto de Grx monotiôlicas quanto ditiôlicas (Tabela 11).

Tabela 11 – ORFs de *A. fumigatus* que potencialmente codificam glutarredoxinas.

Locus tag	NCBI Reference Sequence	Nome proteína	Provável catalítico	mecanismo
AFUA_1G06100	XP_750359.1	GrxA	Ditiólico	
AFUA_1G09090	XP_752276.1	GrxB	Monotiólico	
AFUA_2G14960	XP_755829.1	GrxC	?	
AFUA_4G05950	XP_752229.2	GrxD	?	

As sequências gênicas foram confirmadas através do banco de dados AspGD (<http://www.aspgd.org>) por se tratar de um banco curado para sequências de *Aspergillus* sp.

As 4 ORFs foram sintetizadas pela GenScript® com as seguintes exigências: otimização de códons para expressão em *E. coli*; região N-terminal contendo sítio para *NdeI* e protease 3C; região C-terminal contendo *stop codon* e sítio para *BamHI*; gene inserido em plasmídio de expressão pET28a.

Os plasmídeos foram então transformados em linhagem de *E. coli* BL21 (DE3). Estas foram crescidas e com expressão induzidas seguindo orientações do fabricante. Após a indução, as células foram decantadas por meio de centrifugação 10min/ 4 °C/ 5000 rpm e ressuspendidas em tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4; NaCl 100 mM e imidazol 10 mM. O rompimento das células foi realizado por sonicação (35% amplitude e 5 minutos) e os ácidos nucléicos foram removidos por meio de tratamento com sulfato de estreptomicina (concentração final = 1 %) por 15 minutos. Após este período, o extrato foi centrifugado por 45 min/ 4 °C/ 15000 rpm, o precipitado descartado e os extratos proteicos livres de ácidos nucléicos coletados.

As proteínas foram expressas em vetor que adiciona cauda de histidina e, portanto, foram purificadas por IMAC em colunas HisTrap FF (GE Healthcare) ou Ni-NTA Superflow (Qiagen) em gradiente de imidazol utilizando o cromatógrafo AKTA (GE Healthcare). A qualidade da purificação das proteínas foi constatada por SDS-PAGE em condições redutoras. Após estes procedimentos, as proteínas foram dessalinizadas através de cromatografia de filtração em gel utilizando a coluna PD10 (GE Healthcare) Ultracel YM-3 (Millipore) até concentração final desejada.

Quantificação de proteínas

As proteínas foram e concentradas por centrifugação (5000 rpm/ 4 °C) utilizando concentradores

quantificadas através dos coeficientes de extinção obtidos no *software* Protparam (<http://www.expasy.org/tools/protparam>). Os coeficientes de extinção das Grx ($\lambda = 280$ nm) estão descritos na Tabela 12.

Tabela 12 – Relação dos coeficientes de extinção das Grx de *A. fumigatus* obtidos pelo *software* Protparam.

Proteína	Coeficiente de extinção ($M^{-1} cm^{-1}$)	Peso molecular (Da)
GrxA	6085 _{OXI} / 5960 _{RED}	14355,35
GrxB	9970 _{OXI} / 9970 _{RED}	26634,14
GrxC	24075 _{OXI} / 23950 _{RED}	31987,18
GrxD	8605 _{OXI} / 8480 _{RED}	15704,03

Ensaio de redução do HED

As atividades das Grx foram avaliadas através do monitoramento espectrofotométrico do consumo de NADPH (250 µm) a 340 nm ocasionado pela

redução de 500 μM de hydroxyethyl disulfide (HED) pelas Grx (0; 5; 50; 100; 200; 500; 1000; 5000 μM) na presença de 500 μM de GSH e 0,5 unidade de glutationa redutase (GR) de *S. cerevisiae* (Sigma-Aldrich G3664)¹³¹. Os parâmetros cinéticos aparentes da redução das Grx pela GR foram obtidos através da regressão não-linear de Michaelis-Mentem nos dados do gráfico velocidade \times [Grx].

Ensaio acoplado com sistema Grx

A avaliação da atividade peroxidásica dependente do sistema Grx foi realizada através do ensaio acoplado que monitora o consumo do NADPH a 340 nm. Nestas reações foram adicionados: tampão Tris-Cl 50 mM pH 8,0; NADPH 250 μM ; GSH 1 mM; GR 1 U/ mL; Grx (5 ou 10 μM); Prx 5 μM e H_2O_2 100 μM ¹⁷.

Ascorbato

Avaliação da redução das enzimas AfPrx1 e AfPrxC por ascorbato

Estes ensaios foram realizados sob supervisão do Prof. Dr Gerardo Ferrer-Sueta, no Laboratorio de Fisicoquímica Biológica da Facultad de Ciencias (Universidad de la República – UdelaR, Montevidéu, Uruguai).

Este experimento trata-se de uma cinética competitiva entre o ácido sulfênico da proteína e o reagente 2,6-diclorofenolindofenol (DCPIP) pelo ascorbato. Para tanto, as proteínas foram previamente reduzidas com 20 mM de DTT por 3 h *RT* ou *overnight* a 4 °C e dessalinizadas utilizando PD10 (GE Healthcare) (tampão fosfato de potássio dibásico 100 mM; NaCl 100 mM; HCl até atingir pH 7,2). Posteriormente, as proteínas foram oxidadas estequiometricamente com H_2O_2 , a fim de obter a proteína com a Cys catalítica em ácido sulfênico (Cys-SOH). As concentrações de DCPIP ($\epsilon_{600\text{nm}} = 21500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), ascorbato ($\epsilon_{265\text{nm}} = 14500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e Prx (Tabela 1) foram determinadas espectrofotometricamente.

Os dados foram adquiridos com o espetrômetro *stopped-flow* SX20 (Applied Photophysics). As reações foram acompanhadas através da absorbância do DCPIP ($\lambda = 600$ nm) (abertura do monocromador em 0,5 mm). Pelo menos 6 corridas de 120 s por ponto foram adquiridas para todas as condições.

As soluções utilizadas no *stopped-flow* devem ter o dobro da concentração desejada, uma vez que este equipamento mistura as soluções em partes iguais para

iniciar as reações e as leituras. Uma das seringas do equipamento continha ascorbato (8 μ M) diluído em água e a outra seringa uma mistura de DCPIP (90 μ M) e concentrações crescentes de Prx (0 μ M – 20 μ M), ambos em tampão (fosfato de potássio dibásico 100 mM; NaCl 100 mM pH 7,2). Os ensaios cinéticos foram realizados em condições de pseudo-primeira ordem. Os valores de k_{obs} (s^{-1}) foram definidos a partir do ajuste das curvas obtidas com a equação integrada de primeira ordem e a constante de segunda ordem foi estabelecida pelo ajuste linear do gráfico $k_{obs} \times [Prx\text{-SOH}]$.

Determinação da concentração de ascorbato (ou análogo) intracelular de *A. fumigatus* utilizando HPLC com detecção eletroquímica

As linhagens de *A. fumigatus* wt, $\Delta Afprx1$, $\Delta AfprxB$ e $\Delta AfprxC$ foram crescidas em meio rico YAG (extrato de levedura 0,5%; glicose 2%; elementos traços 1 ml/ L) a 37 °C/ 200 rpm/ *overnight* a partir de solução de esporo (inóculo de 1 \times 10⁷ esporos). Após crescidos, os micélios foram coletados a partir de filtração utilizando bomba a vácuo. A massa celular obtida foi congelada em nitrogênio líquido e, imediatamente antes da análise, macerada em almofariz. Após pulverizadas, cada amostra foi acrescida do tampão de extração (DTPA 1 mM; ácido metafosfórico 3% e ácido acético 8%), sendo adicionado 0,5 mL de tampão para cada grama de fungo. Este tampão de extração foi previamente visto como o melhor para recuperar o ascorbato presente na amostra¹³², adicionalmente, o pH ácido previne a oxidação do ascorbato e precipita as proteínas presentes na amostra. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 13000 rpm/ 15 minutos/ 4°C e o sobrenadante foi filtrado em malha de 0,22 μ m. O filtrado foi diluído 20 vezes antes de ser analisado.

O equipamento utilizado para as análises foi um HPLC com detecção eletroquímica, o ESA *coulochrom III* (Thermo Scientific) com célula analítica modelo 5010. A voltagem foi ajustada para 0,25 V em polaridade positiva. A coluna utilizada foi a coluna de fase reversa Luna® 3 μ m C18 (2) 100 Å 150 \times 4,6 mm (Phenomenex). A fase móvel utilizada foi fosfato de sódio monobásico 100 mM; acetato de sódio 100 mM; DTPA 1 mM; cloreto de dodecil trimetil amônia 0,189 mM; brometo de tetra-*n*-octil amônia 62 mM (previamente dissolvido em metanol – 20 mg em 240 mL de metanol para um volume final de 1 L); pH 5,4 acertado com ácido ortofosfórico¹³³.

Dentro das células, o dehidroascorbato (DHA), produto da oxidação por dois elétrons do ascorbato, também pode ser encontrado. Procuramos analisar também

DHA já que existem sistemas enzimáticos que podem reduzí-lo a ascorbato. Desta forma, as curvas de calibração foram realizadas com ascorbato (Sigma A5960) e com o dehidroascorbato (DHA) (Sigma D8132) em concentrações variando de 0,5 µM até 5 µM. Entretanto, como esta técnica de detecção eletroquímica não é sensível ao DHA, este reagente foi previamente reduzido com TCEP (0,5 µL de TCEP 10 mM em 99,5 µL de DHA na concentração desejada) por 30 minutos antes de cada leitura. Cada ponto da curva de calibração foi obtido através da área do pico correspondente ao ascorbato no cromatograma. A fim de confirmar se o pico visualizado realmente correspondia ao ascorbato, os padrões e, posteriormente, as amostras foram tratados com a enzima ascorbato oxidase (Sigma A0157). Esta enzima é responsável por oxidar o ascorbato a DHA e, desta forma, este tratamento resulta no desaparecimento do pico correspondente ao ascorbato no cromatograma (Figura 35). Caso *A. fumigatus* sintetize eritroascorbato (análogo de ascorbato), este também é oxidado por ascorbato oxidase¹³⁴.

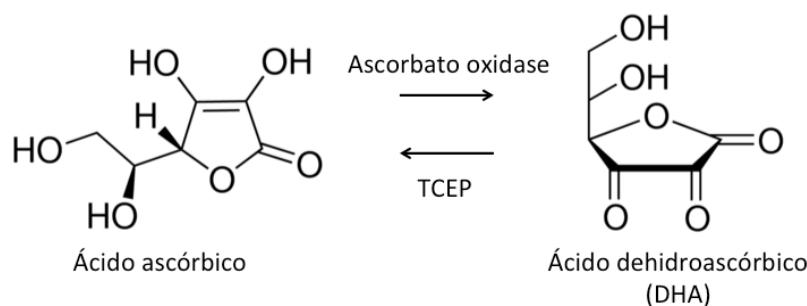


Figura 35 – Representação do ácido ascórbico e ácido dehidroascórbico, bem como suas interconversões.

Cada amostra foi aplicada sem tratamento e com tratamento com TCEP. Assim, na amostra sem tratamento foi medido o ascorbato, na amostra tratada com TCEP foi medido o ascorbato + DHA. Portanto, a quantidade de DHA foi obtida a partir da diferença entre a medida da amostra tratada com TCEP e da amostra sem tratamento.

Experimentos de redução utilizando Ergotioneína, GSH ou H₂S

Os experimentos realizados foram conduzidos sob supervisão do Prof. Dr. Gerardo Ferrer-Sueta, no Laboratorio de Fisicoquímica Biológica da Facultad de Ciencias (Universidad de la República – UdeLaR, Montevidéu, Uruguay). Os dados cinéticos foram obtidos a partir de espectros *time-resolved* das reações entre as Prx e

os peróxidos através da fluorescência intrínseca proteica ($\lambda_{ex} = 280$ nm). Os dados foram adquiridos com o espectrômetro *stopped-flow* SX20 (Applied Photophysics). A abertura do monocromador foi de 2 mm para os experimentos de fluorescência. Pelo menos 12 corridas por ponto foram adquiridas para todas as condições.

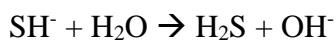
A fim de garantir a uniformidade de estado redox, as proteínas foram previamente tratadas com 20 mM de DTT por 3 horas *RT* ou *overnight* 4 °C. Posteriormente foram dessalinizadas em tampão 2 × (Tris 60 mM; MES 30 mM; ácido acético 30 mM; NaCl 240 mM; DTPA 0,1 mM pH 7,1) com auxílio de coluna PD10 (GE Healthcare). Em seguida, as proteínas foram quantificadas (Tabela 1) e oxidadas com 1 equivalente de H₂O₂ (quantificado espectrofotometricamente, $\lambda = 240$ nm; $\epsilon = 39,4\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Os experimentos conduzidos com AfPrx1 possuíam 0,5 μM de proteína (concentração 1 μM na seringa, antes da mistura) e os experimentos realizados com AfPrxC continham 1 μM final de proteína. Para os experimentos envolvendo agentes redutores, não alteramos o pH (pH 7,1). Todas as reações foram conduzidas a 25 °C.

Para testar a redução das Prx por ergotioneína, esta molécula foi dissolvida em H₂O e a concentração máxima utilizada foi de 500 μM.

Quando o redutor de interesse foi a glutationa (GSH), esta foi dissolvida em H₂O e a concentração máxima utilizada foi de 10 mM.

Por fim, o sulfeto de hidrogênio (H₂S) foi obtido através do sulfeto de sódio (Na₂S • 9 H₂O; MW: 240,18 g/ mol). Quando hidratado, este sal se dissocia e o íon sulfeto (S⁻²) pode se protonar com uma ou duas moléculas de H⁺, gerando o H₂S. Como demonstrado nas equações a seguir:



Desta forma, cristais de Na₂S • 9 H₂O foram dissolvidos em água e a concentração do H₂S gerado foi obtida a partir da massa de sulfeto de sódio inicial. A solução estoque foi mantida em frasco ampola lacrado e sempre manipulada com seringa Hamilton através do septo do frasco ampola. As soluções trabalho foram preparadas no momento do uso e mantidas em seringa plástica com êmbolo. Estes cuidados devem ser tomados pois H₂S é um gás e perde-se facilmente para a atmosfera. Na solução trabalho foi adicionado 1,5 equivalente de HCl já que a solução

contendo H₂S é muito alcalina e alteraria o pH da reação final. Para determinação da constante de segunda ordem entre as Prx e H₂S, as concentrações finais do redutor variaram entre 100 e 5000 μM.

As constantes de segunda ordem das reações foram obtidas através da pendente do gráfico $k_{\text{obs}} \times [\text{redutor}]$.

Resultados e Discussão

Avaliação do sistema Trx como possível redutor de AfPrx1 e AfPrxC

Clonagem, expressão e purificação do sistema Trx de *A. fumigatus*

A clonagem das quatro Trx e da TrxR foi confirmada por digestão, PCR de colônia e sequenciamento (Figura 36). O gene de *trx8g* e *trxR* apresentaram algumas alterações quando comparados com o banco de dados do NCBI. Desta forma, a clonagem destas proteínas foi repetida com cDNA de outra linhagem de *A. fumigatus* 293 e o resultado foi mantido. Isso pode ser um indicativo de erro de anotação, como por exemplo, considerar como exon um segmento de DNA que na verdade é um íntron.

Trx3g

thioredoxin Trx1 [Aspergillus fumigatus Af293]
Sequence ID: [ref|XP_754127.1](#) Length: 109 Number of Matches: 1
► See 2 more title(s)

Range 1: 1 to 105 GenPept Graphics				
Score	Expect	Method	Identities	Positives
199 bits(505)	5e-63	Compositional matrix adjust.	98/105(93%)	99/105(94%)
Query 44	MGVVEELSSLQAFRSQVADMILMVLVDAYADICCPCKAIPKLEELFSNQYANIKFFKVNDK	220		
Sbjct 1	MGVVEELSSLQAFRSQVADMILMVLVDAYADICCPCKAIPKLEELFSNQYANIKFFKVNDK	60		
Query 221	VDPVAQELGVSSMPSFYLFRAGDVYEVKVGANPGLLETYIKKHAE	355		
Sbjct 61	VDPVAQELGVSSMPSFYLFRAGDVYEVKVGANPGLLETYIKKHAE	105		

Trx6g

thioredoxin [Aspergillus fumigatus Af293]
Sequence ID: [ref|XP_750918.1](#) Length: 108 Number of Matches: 2
► See 2 more title(s)

Range 1: 1 to 82 GenPept Graphics				
Score	Expect	Method	Identities	Positives
172 bits(435)	1e-52	Compositional matrix adjust.	82/82(100%)	82/82(100%)
Query 363	MSHGKVIAVDNPVIYKALTSGPVVDDFFATICGPCRRAVPKVGELSEKYSINVRFIQDV	184		
Sbjct 1	MSHGKVIAVDNPVIYKALTSGPVVDDFFATICGPCRRAVPKVGELSEKYSINVRFIQDV	60		
Query 183	DKVRVSVAQEMNIRAMPFTVLYKDQPLERKRVGGNIRELEEMIKSISA	358		
Sbjct 61	DKVRVSVAQEMNIRAMPFTVLYKDQPLERKRVGGNIRELEEMIKSISA	108		

Trx5g

thioredoxin TrxA [Aspergillus fumigatus Af293]
Sequence ID: [ref|XP_753517.1](#) Length: 110 Number of Matches: 1
► See 2 more title(s)

Range 1: 1 to 110 GenPept Graphics				
Score	Expect	Method	Identities	Positives
226 bits(576)	4e-74	Compositional matrix adjust.	110/110(100%)	110/110(100%)
Query 56	MISHNVEKITDIAFKVKEVKGESGPVIVDCSATNCGPCKAISPVFORLSTSSEEFKNAKFYE	235		
Sbjct 1	MISHNVEKITDIAFKVKEVKGESGPVIVDCSATNCGPCKAISPVFORLSTSSEEFKNAKFYE	60		
Query 236	IDVDELSEVAEELGVRAHPPTFHKFDGQKVNEVVGANPPALEAAIKAHVA	385		
Sbjct 61	IDVDELSEVAEELGVRAHPPTFHKDGQKVNEVVGANPPALEAAIKAHVA	110		

Trx8g

thioredoxin [Aspergillus fumigatus Af293]
Sequence ID: [ref|XP_747097.1](#) Length: 116 Number of Matches: 1
► See 2 more title(s)

Range 1: 1 to 116 GenPept Graphics				
Score	Expect	Method	Identities	Positives
226 bits(556)	6e-71	Compositional matrix adjust.	108/116(93%)	108/116(93%)
Query 371	HPTVTEITS-----FEQPKELTDGOKPVVIDFMATWCGPCKAISPLFEKMSDNDEPEYGN	216		
Sbjct 1	HPTVTEITS-----FEQPKELTDGOKPVVIDFMATWCGPCKAISPLFEKMSDNDEPEYGN	60		
Query 215	VGFVKVVDQEGEQVSGEVGRAMPFTVLFKNGVK1GEAVGAAPPRLEGLNLITARS	48		
Sbjct 61	VGFVKVVDQEGEQVSGEVGRAMPFTVLFKNGVK1GEAVGAAPPRLEGLNLITARS	116		

TrxR

thioredoxin reductase Trr1/Trr2 [Aspergillus fumigatus var. RP-2014]
Sequence ID: [gb|KEY76675.1](#) Length: 392 Number of Matches: 3

Range 1: 1 to 226 GenPept Graphics				
Score	Expect	Method	Identities	Positives
368 bits(945)	1e-125	Compositional matrix adjust.	198/226(88%)	201/226(88%)
Query 122	MWHTKV-----VITGSGPAHHTAAZYLSRAELKPVYEGHLANGta	2		
Sbjct 1	MWHTKV-----VITGSGPAHHTAAZYLSRAELKPVYEGHLANGta	2		
Query 123	agglltttDIEINPFGPDGIGGAAELMENRKQSIRPFTGEVITEITISRVLSKKPFKLW			
	A69QLTTTDTIDIEINPFGPDGIGGAAELMENRKQSIRPFTGEVITEITISRVLSKKPFKLW			
	AGGQLTTTDTIEINPFGPDGIGGAAELMENRKQSIRPFTGEVITEITISRVLSKKPFKLW			
	EUNIDGPKDEPACTADAVIATGANARRLNPGEETYQNGISACAVCGDQGPVIFRNPKPLY			
	EUNIDGPKDEPACTADAVIATGANARRLNPGEETYQNGISACAVCGDQGPVIFRNPKPLY			
	EUNIDGPKDEPACTADAVIATGANARRLNPGEETYQNGISACAVCGDQGPVIFRNPKPLY			
	VIGGGDOSAAEAMFLAKYGSSVTVLVRDRDLRAsKAPAKRLLAHPKVKTVRFNTVATEVLGI			
	VIGGGDOSAAEAMFLAKYGSSVTVLVRDRDLRAsKAPAKRLLAHPKVKTVRFNTVATEVLGI			
	VIGGGDOSAAEAMFLAKYGSSVTVLVRDRDLRAsKAPAKRLLAHPKVKTVRFNTVATEVLGI			
	EKXPNGLIHTLRKIHITVGEEEVWDANGLPYAVGHDPATAUVKGQZDUDDEDGYIITKPGT			
	EKXPNGLIHTLRKIHITVGEEEVWDANGLPYAVGHDPATAUVKGQZDUDDEDGYIITKPGT			
	EKXPNGLIHTLRKIHITVGEEEVWDANGLPYAVGHDPATAUVKGQZDUDDEDGYIITKPGT			
	NST1QPAAQEWNGDVKKDPKGVPEYKSMPILL			
	NST1QPAAQEWNGDVKKDPKGVPEYKSMPILL			
	NST1QPAAQEWNGDVKKDPKGVPEYKSMPILL			

Figura 36 – Resultado do sequenciamento após a clonagem do sistema Trx de *A. fumigatus*.

A fim de realizar uma comparação *in silico* direta entre as quatro Trx presentes no fungo, um alinhamento foi realizado. Neste alinhamento é possível notar que as quatro Trx possuem tamanho compatível com as outras Trx previamente descritas (aproximadamente 110 aminoácidos) e que possuem o motivo Trx CxxC conservado. Estes são fortes indícios de que as proteínas em foco realmente tratam-se de Trx (Figura 37). As proteínas foram obtidas com alto grau de pureza para a realização dos experimentos *in vitro* descritos a seguir (Figura 38).

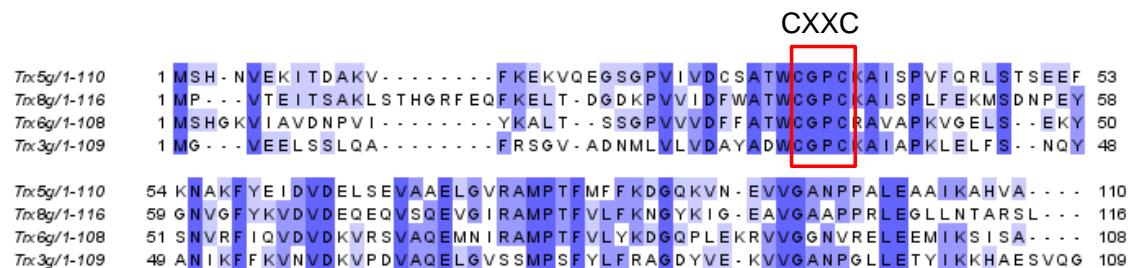


Figura 37 – Alinhamento das sequências primárias das quatro Trx de *A. fumigatus* realizado através da ferramenta de bioinformática ClustalW. Em destaque está o motivo Trx CXXC presente nas quatro isoformas (box vermelho).

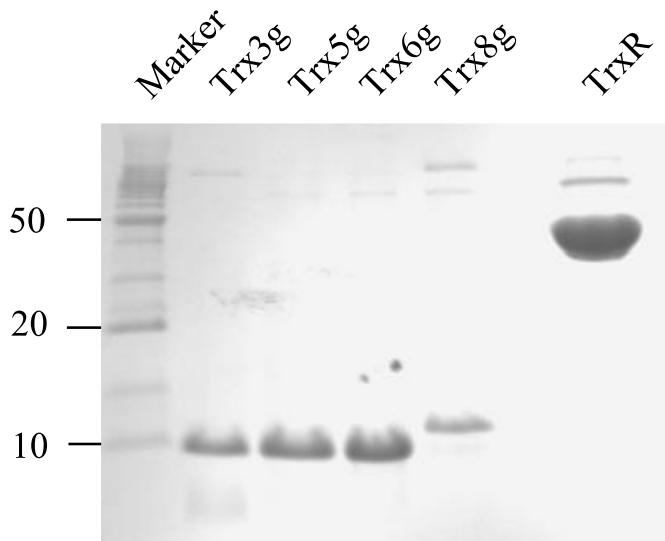


Figura 38 – SDS-PAGE redutor com resultado das purificações das proteínas: Trx3g de 11,936 kDa (*lane 2*); Trx5g de 11,975 kDa (*lane 3*); Trx6g de 11,913 kDa (*lane 4*); Trx8g de 12,856 kDa (*lane 5*) e TrxR de 42,190 kDa (*lane 6*). O marcador (*lane 1*) utilizado foi BenchMark™ Protein Ladder (Life Technologies) e os pesos moleculares estão expressos em kDa.

Ensaio de redução do DTNB (Ellman's reagent)

Para testar se as Trx clonadas eram capazes de reduzir dissulfetos e se estavam interagindo com a TrxR clonada (sendo reduzidas pela TrxR), o ensaio de redução do

DTNB (uma molécula contendo um dissulfeto artificial) foi realizado. Este ensaio já é classicamente utilizado para comparar a interação de diferentes Trx com TrxR¹²⁷.

As constantes cinéticas aparentes foram determinadas pela regressão não linear usando a equação de Michaelis-Menten (Figura 39) e estão descritas na Tabela 13. Podemos notar que todas as Trx apresentaram atividade de redução de dissulfeto e são reduzidas pela TrxR. Entretanto, a Trx6g possui eficiência catalítica uma ordem de grandeza menor que as outras Trx.

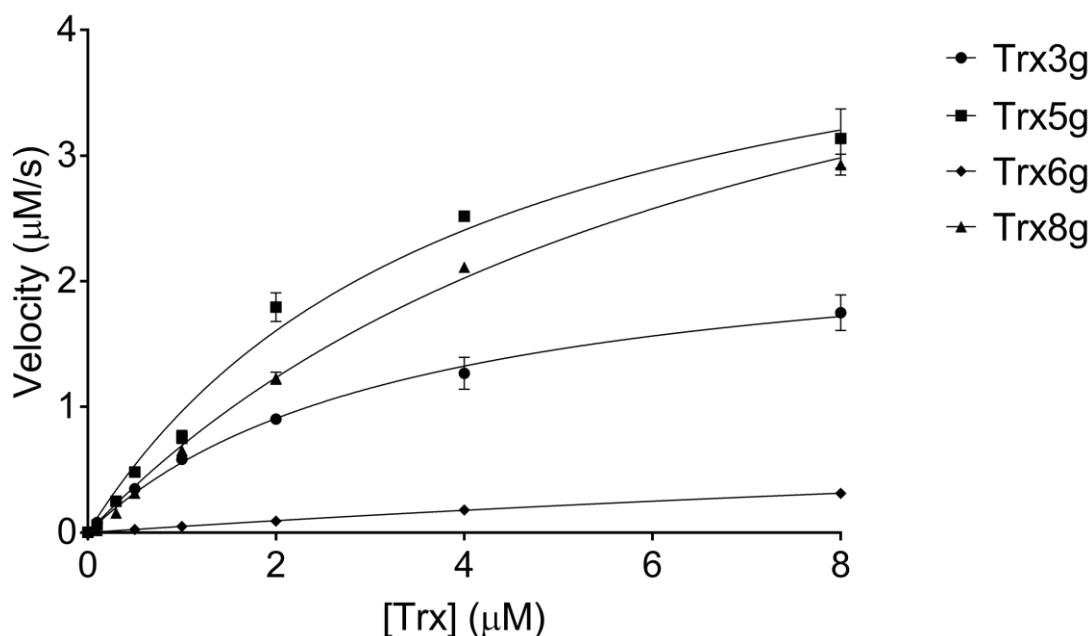


Figura 39 – Redução espécie-específica das Trx Trx3g (●), Trx5g (■), Trx6g (◆), Trx8g (▲) pela TrxR, todas de *A. fumigatus*. A concentração de TrxR foi fixada em 0,3 μM, e as concentrações das Trx variaram entre 0,1 a 8 μM. As reações foram iniciadas com a adição de 200 μM de NADPH, o doador de elétrons da reação. Os outros reagentes do ensaio incluem 0,1 mg/mL de BSA e 250 μM de DTNB. As constantes cinéticas aparentes foram determinadas pela regressão não linear de Michaelis-Menten usando o software GraphPad.

Tabela 13 – Parâmetros cinéticos aparentes da redução das Trx pela TrxR, todas de *A. fumigatus*.

	Trx3g	Trx5g	Trx6g	Trx8g
R ²	0,9905	0,9840	0,9946	0,9904
k _{cat} ^{app} (s ⁻¹)	8,7	16,0	2,6	15,4
K _m ^{app} (μM)	3,8	4,0	12,7	5,1
k _{cat} /K _m (M ⁻¹ s ⁻¹)	2,3 × 10 ⁶	4 × 10 ⁶	2 × 10 ⁵	3 × 10 ⁶

Ensaio acoplado com o sistema Trx

Após verificar que as Trx e a TrxR de *A. fumigatus* estão funcionalmente ativas e reduzindo o dissulfeto artificial (DTNB) com eficiência elevada (10⁵ – 10⁶ M⁻¹ s⁻¹)

1 s^{-1}), partimos para verificar se o sistema Trx seria capaz de reduzir AfPrx1 e AfPrxC e, consequentemente, suportar a atividade redox destas proteínas. Para tanto, foi realizado o ensaio de oxidação do NADPH, o doador final de elétrons da cascata de reações¹²⁸.

Neste ensaio, foi possível verificar que nenhuma das quatro Trx foi capaz de reduzir as AfPrx1 e AfPrxC em níveis mensuráveis nas condições experimentais empregadas. Verificamos que a velocidade de reação do sistema completo ($\text{H}_2\text{O}_2 - \text{Prx} - \text{Trx} - \text{TrxR} - \text{NADPH}$) foi a mesma do controle sem a Prx ($\text{H}_2\text{O}_2 - \text{Trx} - \text{TrxR} - \text{NADPH}$), desta forma, pudemos concluir que a velocidade medida nos ensaios na realidade é a velocidade de reação da própria Trx com o H_2O_2 .

Segundo Pedrajas et al., 2016¹³⁰, a presença de GSH estimula a atividade peroxidásica dependente de Trx de Prx1p de *S. cerevisiae* (Prx6 de levedura). Desta forma, decidimos verificar a interferência de GSH na velocidade das reações dos sistemas envolvendo Prx e Trx/ TrxR. Entretanto, para as Prx6 de *A. fumigatus*, a presença de GSH não favoreceu a ciclagem destas enzimas (dados não apresentados).

Desta forma, podemos concluir que o sistema Trx, na ausência ou presença de GSH, não é capaz de reduzir de maneira eficiente as AfPrx1 e AfPrxC.

Avaliação do sistema Grx como possível redutor de AfPrx1 e AfPrxC

Identificação, síntese gênica e purificação do sistema Grx de *A. fumigatus*

A identificação das ORFs de Grx em *A. fumigatus* foi realizada através de comparação com as Grx monotiólicas e ditíólicas de *S. cerevisiae*. As sequências gênicas foram confirmadas através do banco de dados AspGD (<http://www.aspgd.org>) por se tratar de um banco curado para sequências de *Aspergillus* sp. A principal diferença observada entre as sequências obtidas no banco de dados do NCBI e do AspGD foi com relação ao gene AFUA_1G09090 (*grxB*). No NCBI, o gene *grxB* está anotado de forma mais curta do que a anotação do AspGD. Como no formato do NCBI não aparece a Cys peroxidásica, provavelmente foi atribuído erroneamente a sequencia faltante como íntron (Figura 40). Os plasmídeos foram transformados em BL21 (*DE3*) e após a expressão e purificação proteica, as Grx foram obtidas com alto grau de pureza (Figura 41).

Download ▾ GenPept Graphics

Glutaredoxin domain protein [Aspergillus fumigatus Af293]

Sequence ID: [XP_752276.1](#) Length: 226 Number of Matches: 1

Range 1: 38 to 226 GenPept Graphics					▼ Next Match	▲ Previous Match
Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	
366 bits(939)		7e-127	Compositional matrix adjust.	188/214(88%)	189/214(88%)	25/214(11%)
Query 2	RSTVAAIDAHREAKEAASKQNVQPQKPAPPKPVVEENAKP VQEAQGVKATTPKGASEEME			61		
Sbjct 38	RSTVAAIDAHREAKEAASKQNVQPQKPAPPKPVVEENAKP VQEAQGVKATTPKGASEEME			97		
Query 62	EIPIAGRTKMTVPKNRGQDSQKQESALASSEDDLEV KNELNAILKRSPIVIFSKSYSYCPYS			121		
Sbjct 98	EIPIAGRTKMTVPKNRGQDSQKQESALASSEDDLEV KNELNAILKRSP+-----			146		
Query 122	KRAKTIILLEKYNIVPAPHVVELDQHAMGQQLQS LLAKNTGRRTVPNVNLVNGKSIGGGDDV			181		
Sbjct 147	-----PAPHVVELDQHAMGQQLQS LLAKNTGRRTVPNVNLVNGKSIGGGDDV			192		
Query 182	TALDEKDELASTLKNLGGKW IQEVENRKDQTKQAE			215		
Sbjct 193	TALDEKDELASTLKNLGGKW IQEVENRKDQTKQAE			226		

Figura 40 – Alinhamento entre a sequência de aminoácidos de GrxB do banco de dados AspGD (query) e NCBI (sbjct). É possível notar que a sequência presente no NCBI é menor e falta a Cys catalítica (destaque vermelho).

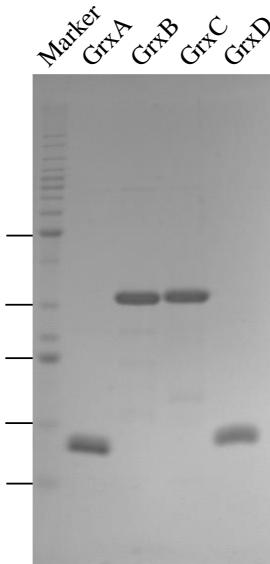


Figura 41 – SDS-PAGE redutor com resultado da purificação das enzimas Grx de *A. fumigatus*: GrxA de 14,355 kDa (lane 2); GrxB de 26,634 kDa (lane 3); GrxC de 31,987 kDa (lane 4); GrxD de 15,704 kDa (lane 5). O marcador (lane 1) utilizado foi BenchMark™ Protein Ladder (Life Technologies) e os pesos moleculares estão expressos em kDa.

Ensaio de redução do HED

A fim de verificar se as Grx recombinantes estavam ativas, analisamos a capacidade destas proteínas de reduzir o dissulfeto presente na molécula HED (dissulfeto misto entre β-mercaptopetanol e GSH). Entre as 4 Grxs analisadas, apenas as GrxA e GrxB apresentaram-se enzimaticamente ativas (Figura 42). Ao examinar a estrutura primária destas enzimas, foi possível verificar que a GrxA provavelmente

pertence a subfamília das Grx ditiólicas por apresentar o motivo catalítico CxxC e massa molecular próxima de 15 kDa. Por outro lado, a GrxB possui a Cys catalítica no motivo CxxS e massa molecular por volta de 26 kDa, características de Grx monotiólica (Figura 43) ^{17,135}.

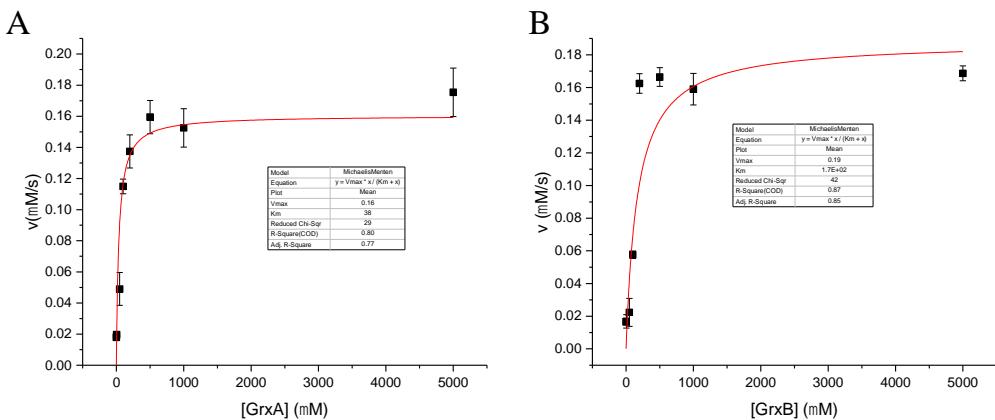


Figura 42 – Redução espécie-específica das glutaredoxinas GrxA e GrxB de *A. fumigatus* pela GR de *S. cerevisiae*. A atividade das Grx foi avaliada através do monitoramento espectrofotométrico do consumo de NADPH (250 μ M) a 340 nm, doador final de elétrons da cascata de reações. A redução de hydroxyethyl disulfide (HED) (500 μ M) foi realizada pelas Grx (0; 5; 50; 100; 200; 500; 1000; 5000 μ M) na presença de GSH (500 μ M) e GR de *S. cerevisiae* (Sigma G3664) (0,5 unidade) ¹³¹. As constantes cinéticas aparentes foram determinadas pela regressão não linear de Michaelis-Menten usando o software Origin.

```
>GrxA_(Af1LG06100)
MSAAKTKAQNLINENAVVVFSKSYCPYCNASKTLKDILGAKFYALELDEIDDGREIQNALYE
MTQQRTVPNIFIGQKHIGGNSELQAKSAQLPALLKEAGAL
```

```
>GrxB_(Af1LG09090)
MRSTVAAIDAHREAKEAASKQNVQPQKPAPPKPVEENAKPVVQEADGVKATTPKGASEEMEE
IPIAGRTKMTVPKNRGQDSQKQESALASSEDDLEVKNELNAILKRSPIVIFSKSYCPYSKRA
KTILEKYNIVPAPHVVELDQHAMGQQLQSLLAKNTGRRTVPNVLVNGKSIGGGDDVTALDE
KDELASTLKNLGGKWIQEVRKDQTQAE
```

- ! - Motivo Grx ditiólica
- ! - Motivo Grx monotiólica

Figura 43 – Estrutura primária das GrxA (monotiólica) e GrxB (ditiólica) ativas de *A. fumigatus*.

Ensaio acoplado com sistema Grx

A fim de verificar se a atividade peroxidásica de AfPrx1 e AfPrxC poderia ser suportada pelo sistema Grx, utilizamos as enzimas GrxA e GrxB como redutores

diretos das Prx, já que estas enzimas apresentaram-se ativas no ensaio com HED. Entretanto, as velocidades das reações com ou sem Grx foram essencialmente as mesmas. Desta forma, o sistema Grx não funciona como redutor biológico das AfPrx1 e AfPrxC de *A. fumigatus*, pelo menos nas condições analisadas.

Avaliação de ascorbato como redutor de AfPrx1 e AfPrxC

Em 2007 foi demonstrado pela primeira vez que ascorbato pode funcionar como redutor de 1-Cys Prx¹⁵. Por ser uma molécula amplamente distribuída entre os organismos, poderia representar redutor praticamente universal das Prx6. Esta descoberta revolucionou o paradigma da necessidade de um redutor tiólico para as Prx e expandiu o horizonte para novas moléculas atuarem como redutores das 1-Cys Prx.

A fim de verificar a relevância biológica desta reação, a Dra. Valesca Anschau determinou a constante de reação entre algumas Prx6 oxidadas (RSOH) e ascorbato na ordem de $k = 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ¹³⁶, valor que pode reforçar a relevância desta molécula como eficiente redutor biológico dependendo dos níveis intracelulares de ascorbato em cada organismo.

Desta forma, utilizamos o ensaio de cinética competitiva com DCPIP para verificar se as AfPrx1 e AfPrxC também poderiam ser reduzidas por esta molécula. Estes ensaios foram realizados no laboratório do Prof. Dr. Gerardo Ferrer-Sueta, na Universidad de la República (UdelaR), Uruguai. Apesar de diversos homólogos destas proteínas interagirem com ascorbato, AfPrx1 e AfPrxC não são reduzidos por esta molécula. Esse resultado foi surpreendente, pois até então todas as 1-Cys Prx analisadas mostraram ser reduzíveis por ascorbato. A proteína PER1, Prx6 de *Trichium aestivum*, foi utilizada como controle positivo do ensaio (Figura 44).

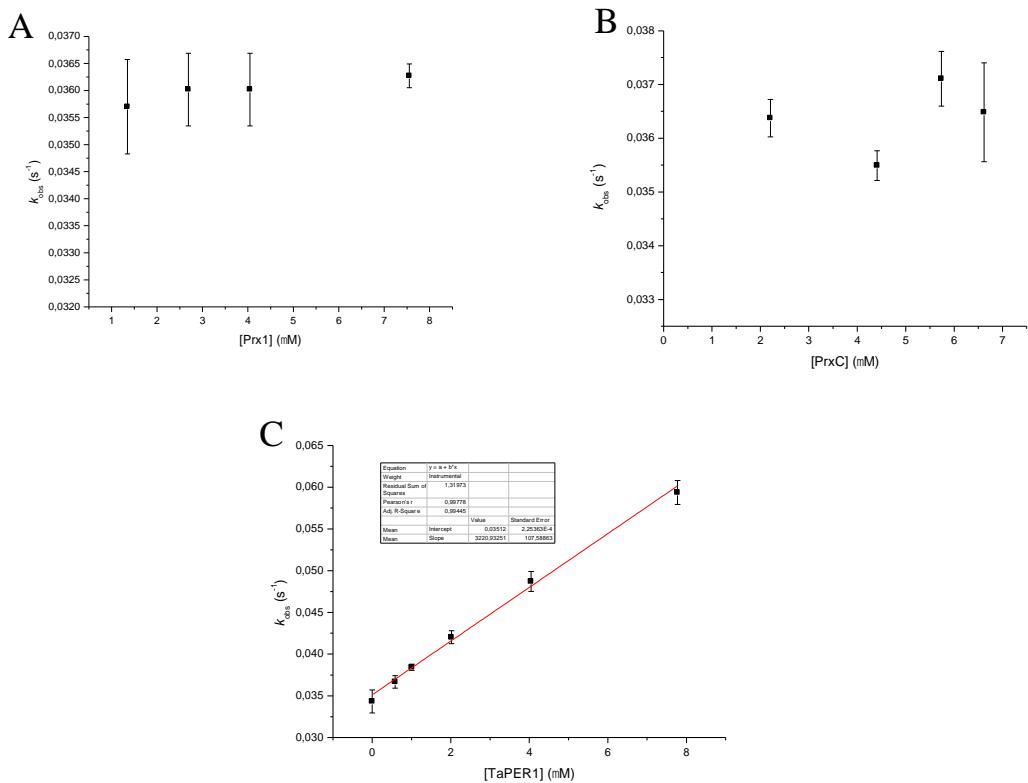


Figura 44 – Resultado da cinética competitiva entre Prx-SOH e DCPIP pelo ascorbato. Tanto AfPrx1 (A) quanto AfPrxC (B) não são reduzidas por ascorbato. A proteína PER1 de *T. aestivum* foi utilizada como controle positivo do experimento ($k = 3,2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

Determinação da concentração de análogo de ascorbato intracelular em *A. fumigatus* utilizando HPLC com detecção eletroquímica

A determinação dos níveis de ascorbato, ou seu análogo, intracelular em *A. fumigatus* é de grande interesse, já que velocidade de redução de Prx é dada por:

$$v = k \cdot [\text{Prx-SOH}] \cdot [\text{redutor}]$$

De acordo com a literatura, os fungos podem sintetizar tanto o L-ascorbato quanto o D-eritroascorbato^{137,138}. Adicionalmente, estas moléculas podem estar ligadas a diferentes açúcares^{139,140}. As enzimas envolvidas na síntese de L-ascorbato são L-galactose desidrogenase (B) e L-galactono-1,4-lactona desidrogenase (A) e as enzimas envolvidas na síntese de D-eritroascorbato são D-arabinose desidrogenase (B') e D-arabinono-1,4-lactona oxidase (A'). *S. cerevisiae* utiliza as enzimas A' e B' e, portanto, sintetiza D-eritroascorbato¹³⁷. Entretanto, ensaios *in vitro* com estas enzimas de levedura juntamente com L-galactose (precursor do L-ascorbato) demonstram que estas mesmas enzimas podem sintetizar L-ascorbato¹⁴¹. Desta forma, pode-se concluir que apesar de se tratarem de vias metabólicas distintas, estas

vias podem se interconverter e os diferentes produtos formados dependem do tipo de açúcar precursor (L-galactose ou D-arabinose). Alguns alinhamentos realizados através de BLAST utilizando como *input* estas enzimas de *S. cerevisiae* contra o genoma de *A. fumigatus* revelam ORFs com altas taxas de positividade (59% e 54%, respectivamente). Estas ORFs, portanto, representam grande evidência de que *A. fumigatus* é capaz de sintetizar D-eritroascorbato (Figura 45).

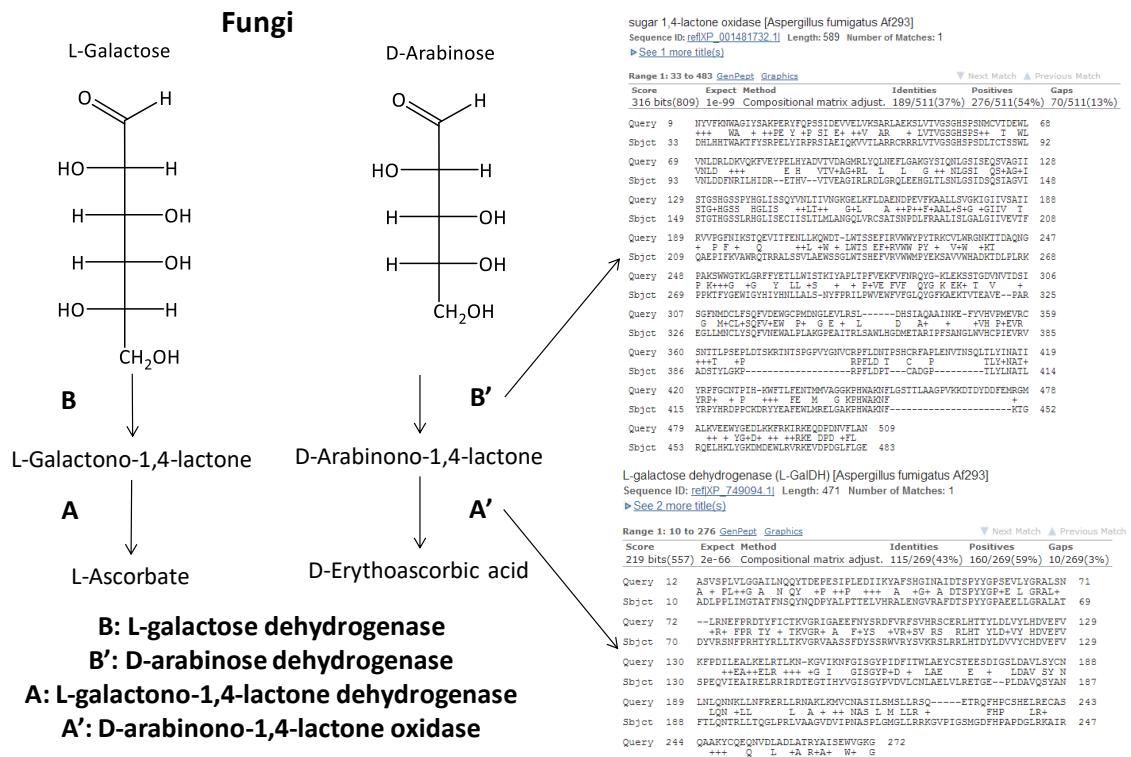


Figura 45 - Vias metabólicas de L-Ascorbato e D-Eritroascorbato em fungos. A partir de alinhamentos utilizando a ferramenta BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), resultados de ORFs de *A. fumigatus* com altas taxas de positividade com enzimas da via metabólica de síntese de L-eritroascorbato de *S. cerevisiae* indicam que *A. fumigatus* produz D-eritroascorbato endogenamente.

Os níveis de D-eritroascorbato foram investigados nas linhagens wt, $\Delta Afprix1$, $\Delta AfprixB$ e $\Delta AfprixC$. Os cromatogramas foram analisados primeiramente a fim de identificar o pico correspondente ao D-eritroascorbato. Para tanto, as amostras foram tratadas com ascorbato oxidase. O pico que desaparece após este tratamento corresponde ao D-eritroascorbato (Figura 46). Posteriormente, as áreas dos picos foram calculadas. Os resultados obtidos revelam que *A. fumigatus* é capaz de sintetizar D-eritroascorbato (ou L-ascorbato) em níveis de aproximadamente 200 μM . Esta produção é muito semelhante em todas as linhagens, bem como é similar a razão

de D-eritroascorbato/ DEHA (Tabela 14). Como as propriedades físico-químicas do eritroascorbato são muito similares às propriedades do ascorbato, para os experimentos utilizando o ESA, bem como a oxidação por ascorbato oxidase e redução por TCEP, não há necessidade de adaptação de protocolo para análise de ascorbato ou eritroascorbato^{134,142,143}. Adicionalmente, está em progresso a validação deste resultado utilizando HPLC-MS. Esta técnica também nos irá informar de maneira inequívoca qual molécula (D-eritroascorbato ou L-ascorbato) é produzida por *A. fumigatus*.

Apesar do ascorbato não reduzir as AfPrx1 e PrxC *in vitro*, é possível que o análogo desta molécula em *A. fumigatus* desempenhe esta função.

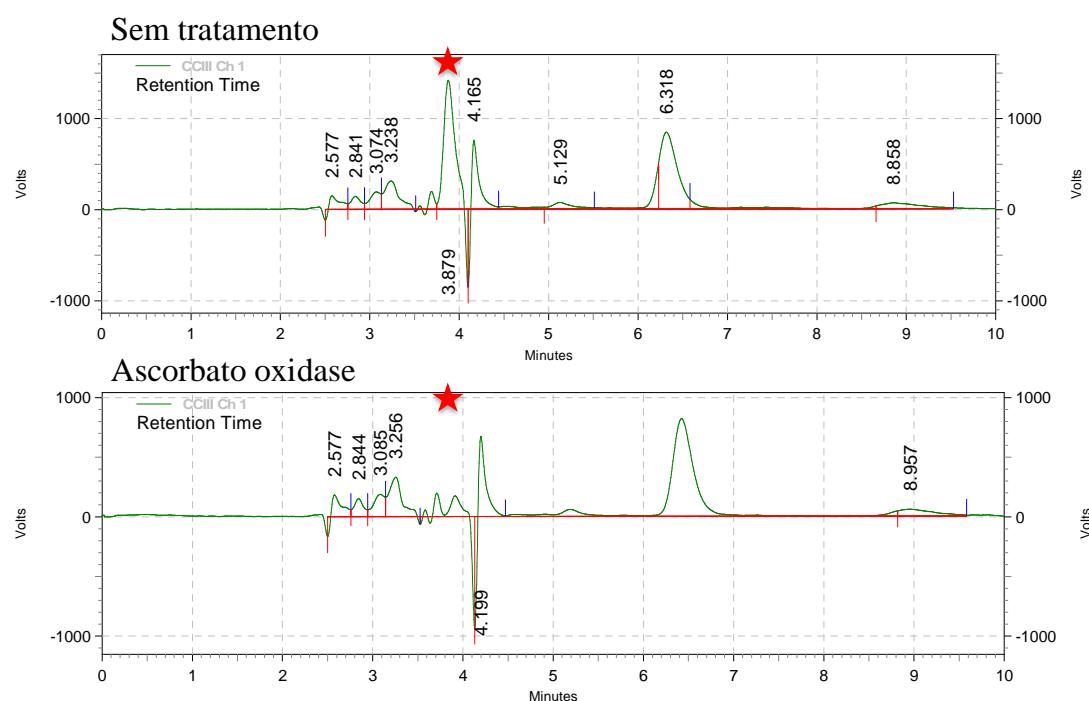


Figura 46 – Cromatogramas representativos das amostras de *A. fumigatus*. O cromatograma superior corresponde à amostra sem tratamento e o cromatograma inferior corresponde à amostra após tratamento com ascorbato oxidase. As estrelas vermelhas indicam o pico que desaparece após este tratamento e corresponde, portanto, ao D-eritroascorbato.

Tabela 14 – Níveis de D-eritroascorbato (Easc) intracelular de *A. fumigatus*. DEHA representa a molécula oxidada de D-eritroascorbato.

	Easc total (μM)	Easc (μM)	DEHA (μM)	Easc/DEHA (μM)
wt	160	34	127	0,26
ΔAfp_{rxA}	225	50	176	0,28
ΔAfp_{rxB}	224	50	174	0,28
ΔAfp_{rxC}	200	41	160	0,25

Avaliação de ergotioneína como molécula redutora de AfPrx1 e PrxC

Em 1909, Charles Tanret isolou um composto cristalino rico em enxofre do fungo *Claviceps purpurea*, conhecido como esporão-do-centeio ou *ergot* em inglês (daí o nome ergotioneína) ¹⁴⁴. A ergotioneína (EGT) é um tiól de baixo peso molecular aparentemente produzido apenas por fungos não leveduriformes e alguns tipos de bactérias e cianobactérias. Apesar de não produzirem, plantas e animais adquirem esta molécula do ambiente e a acumulam em praticamente todas as células e tecidos até níveis mM ¹⁴⁵.

EGT em solução existe como tautômero entre as formas tiól e tiona, sendo a última predominante em pH fisiológico. O potencial redox do par tiól-dissulfeto é por volta de -0,06 V, muito maior a outros tióis naturais como GSH (-0,26 V). Quanto mais positivo este valor for, maior a tendência da molécula se manter em sua forma reduzida. Desta forma, EGT é um composto muito estável em condições fisiológicas (sofre pouca autoxidação) ¹⁴⁶.

Diversos estudos apontam o papel antioxidante desta molécula *in vitro* e *in vivo*. Em *Neurospora crassa*, por exemplo, EGT auxilia na proteção dos conídios contra *t*-BOOH durante o período quiescente entre a conidiogênese e a germinação, bem como durante a germinação ¹⁴⁷.

Desta forma, formulamos a hipótese de que ergotioneína poderia ser um redutor para as Prx6 de *A. fumigatus*. Para tanto, a fluorescência intrínseca das proteínas AfPrx1 e AfPrxC oxidadas a ácido sulfênico foram acompanhadas após sua interação com EGT. Novamente, não foi possível observar redução das 1-Cys Prx de *A. fumigatus*. Portanto, não é provável que EGT seja o redutor biológico destas proteínas (Figura 47).

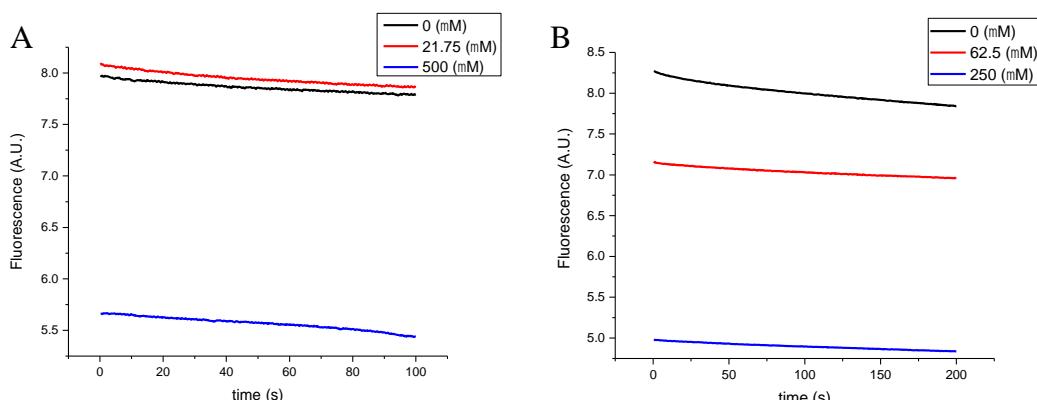


Figura 47 – Gráfico curso temporal que acompanha a fluorescência intrínseca das proteínas AfPrx1 (A) e AfPrxC (B), previamente oxidadas a ácido sulfônico, após a interação com EGT. Nota-se que a inclinação da curva é a mesma na ausência (curvas pretas) e presença (curvas vermelha e azul) de EGT.

Glutationa como molécula redutora de AfPrx1 e AfPrxC

Apesar da GSH não ter favorecido a redução das AfPrx1 e AfPrxC pelo sistema Trx, testamos a eficiência da redução das Prx diretamente por esta molécula. Este experimento foi acompanhado através da fluorescência intrínseca das proteínas ($\lambda_{ex} = 280$ nm). Foi possível verificar que GSH interage com as Prx de *A. fumigatus*, porém com baixa eficiência catalítica (Figura 48) ($k_{AfPrx1} = 1,66 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; $k_{AfPrxC} = 68,7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Desta forma, é pouco provável que GSH funcione sozinha como redutora destas enzimas.

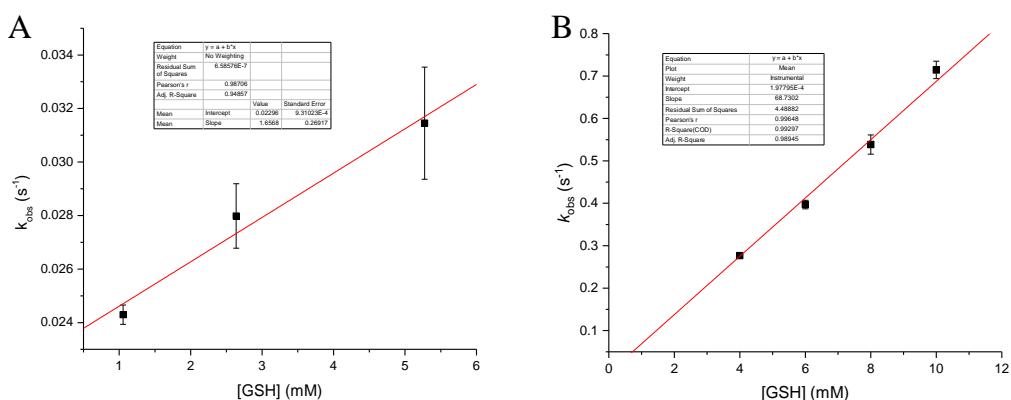


Figura 48 – Cinética das reações de redução de AfPrx1 (A) e AfPrxC (B) por GSH. As reações continham: tampão (Tris 30 mM; MES 15 mM; ácido acético 15 mM; NaCl 120 mM; DTPA 0,05 mM; pH 7,1); Prx-SOH (AfPrx1 0,5 μM ou AfPrxC 1 μM) e GSH (1 – 10 mM).

H₂S como molécula redutora de AfPrx1 e AfPrxC

Sulfeto de hidrogênio (H₂S) acompanha a evolução da vida na Terra desde sua origem. Em diferentes teorias H₂S desempenha papéis em processos sintéticos, catalíticos e de produção energética ¹⁴⁸. H₂S é um gás incolor, solúvel em água (101,3 mM/ atm a 25 °C), com odor característico de ovos apodrecidos. Esta molécula ocorre naturalmente em lugares como gases vulcânicos, fontes hidrotermais e petróleo bruto. Bactérias e fungos liberam esta molécula durante a decomposição de proteínas, lipídios ou polissacarídeos com enxofre e pela redução direta do sulfato (SO₄⁻²) ¹⁴⁹.

Suas consequências tóxicas, principalmente em relação a inibição da respiração celular (inibição da citocromo c oxidase), são altamente estudadas desde sua primeira descrição em 1713. Estão relacionadas com grandes eventos de extinção em massa e, mais recentemente, com problemas ambientais ocasionados pelos resíduos gerados sobretudo pelas indústrias. Na década de 1940, foram descobertas vias metabólicas para a formação de H₂S em mamíferos. Mas apenas na década de 1990 que descobertas envolvendo o papel regulador/ sinalizador do H₂S foram realizadas. Entre os diversos papéis desempenhados pelo H₂S, inclui-se vasodilatação, neuromodulação e proteção contra estresse oxidativo ¹⁵⁰.

O interesse pelas funções biológicas desta molécula, um gasotransmissor, segue aumentando e um dos mecanismos moleculares pelo qual H₂S desempenha funções é através da interação com tióis oxidados ¹⁵¹.

Através de comunicação pessoal, a Profa. Dra. Beatriz Alvares (UdelaR, Uruguai) nos informou que a Prx AhpE de *Micobacterium tuberculosis* reage com H₂S através de sua Cys oxidada (RSOH), gerando persulfeto e posteriormente retornando a seu estado reduzido (RS⁻) (k na ordem de 10^3 M⁻¹ s⁻¹ em pH 7,4, 25 °C). Porém, provavelmente H₂S não atua como o redutor preferencial de AhpE *in vivo* pois não compete com o sistema micotiol/ micorredoxina ¹⁵².

Nas Prx6, subfamília das Prx do presente estudo, a Cys catalítica se mantém em ácido sulfênico (RSOH) devido a ausência da Cys de resolução ¹⁵³. Desta forma, postulamos que o H₂S poderia reagir com a Prx oxidada, gerando persulfeto (RSSH), ou mesmo restaurando o estado reduzido da proteína.

Para tanto, a fluorescência intrínseca das proteínas AfPrx1 e AfPrxC oxidadas a ácido sulfênico foram acompanhadas após sua interação com H₂S. Foi possível observar que H₂S interagiu com AfPrx1 ($k = 3,1 \times 10^3$ M⁻¹ s⁻¹) e com AfPrxC ($k = 4,6 \times 10^4$ M⁻¹ s⁻¹) (Figura 49). Desta forma, H₂S poderia funcionar como redutor biológico das Prx6 de *A. fumigatus*.

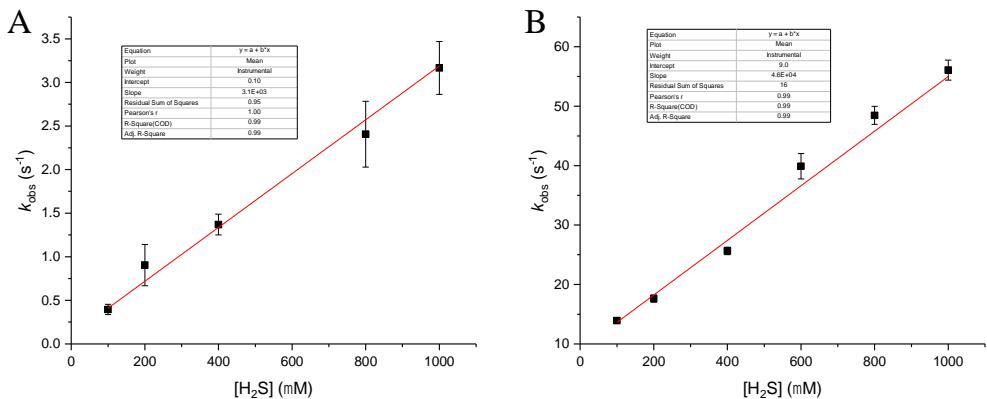


Figura 49 – Cinética das reações de redução de AfPrx1 (A) e AfPrxC (B) por H₂S. As reações continham: tampão (Tris 30 mM; MES 15 mM; ácido acético 15 mM; NaCl 120 mM; DTPA 0,05 mM; pH 7,1); Prx-SOH (AfPrx1 0,5 μM ou AfPrxC 1 μM) e H₂S (100 – 5000 μM).

Avaliação dos possíveis redutores de AfPrx1 e AfPrxC de *A. fumigatus*

No presente trabalho foram avaliados como possíveis agentes redutores de AfPrx1 e AfPrxC: sistema Trx, sistema Grx, ascorbato, ergotioneína, glutationa e sulfeto de hidrogênio (Tabela 15). Dentre as moléculas analisadas, apenas GSH e H₂S foram capazes de reduzir estas enzimas. Entretanto, apenas H₂S reduziu com eficiência comparável aos outros sistemas redutores de 1-Cys Prx.

Considerando os redutores já descritos para as Prx que possuem apenas uma Cys envolvida no ciclo catalítico (Prx 1-Cys), é possível notar que existe grande heterogeneidade destes agentes. Para Prx1p de *S. cerevisiae*, por exemplo, já foram descritos como possíveis redutores o sistema Trx²⁷, o sistema Grx⁷, sistema Trx com GSH⁵ e ascorbato¹¹. Por outro lado, as Prx6 de mamíferos são reduzidas por GSH na presença de πGST. A Prx AOP de *P. falciparum* utiliza o sistema Grx (na presença de GSH) como doador de elétrons²⁸. A proteína AhpE de *M. tuberculosis* é reduzida pelo sistema micotiol/ micotioredoxina²⁵ e por H₂S (comunicação pessoal da Profa. Dra. Beatriz Alvarez).

Considerando a literatura e os resultados do presente trabalho, cogitamos 3 possíveis cenários envolvendo a redução das 1-Cys Prx:

1. O redutor universal ainda não foi descoberto. Podendo ser uma molécula já conhecida ou ainda não descrita, mas que preferencialmente reaja com alta eficiência catalítica com estas enzimas para que sua relevância se sobressaia em relação aos sistemas já descritos.

2. Os redutores são realmente heterogêneos e precisam ser testados para cada 1-Cys Prx estudada. Provavelmente reagem com as Prx-SOH com eficiência moderada ($k = 10^3 - 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).
3. As 1-Cys Prx podem atuar preferencialmente como sinalizadores redox e a etapa de redução do ácido sulfênico seria lenta para favorecer a sinalização celular.

Desta forma, estudos complementares envolvendo novos redutores das 1-Cys Prx bem como o papel destas enzimas na sinalização celular são imprescindíveis para compreensão global do papel destas proteínas na defesa antioxidante *in vivo*.

Tabela 15 – Resultado da avaliação de possíveis agentes redutores de AfPrx1 e AfPrxC de *A. fumigatus*. Constantes de segunda ordem expressas em $\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

	Trx	Grx	Asc	EGT	GSH	H_2S
AfPrx1	NR	NR	NR	NR	1,66	$3,1 \times 10^3$
AfPrxC	NR	NR	NR	NR	68,7	$4,6 \times 10^4$

Parte III – Caracterização da atividade de PLA₂ das Prx6 de *A. fumigatus*

Materiais e Métodos

Análise estrutural de AfPrx1 e AfPrxC

Modelos estruturais de AfPrx1 e AfPrxC foram gerados pelo servidor Swiss-Model (<https://swissmodel.expasy.org>). Estes modelos foram analisados e visualizadas pelo programa UCSF Chimera (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>).

Avaliação da atividade de PLA₂

Experimentos realizados durante Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE) (Processo FAPESP 2016/12248-5) no laboratório do Prof. Dr. Aron B. Fisher, University of Pennsylvania (Anexo III).

Preparação de homogenato de pulmão

Estudo aprovado pelo University of Pennsylvania's Animal Care and Use Committee. A linhagem de camundongo utilizada foi C5B1/6 selvagem. Após a administração da anestesia (ketamina/ xilazina 100/10 mg/kg), foi realizada uma laparotomia-toractomia. Então, a traqueia manteve-se continuamente ventilada e a artéria renal esquerda foi cortada. O pulmão foi lavado com PBS para retirada do sangue da artéria via ventrículo direito. O pulmão foi então removido, homogeneizado com 1 mL de PBS usando um homogeneizador de tecido ¹⁵⁴. As proteínas totais foram quantificadas através do reagente Protein Assay Dye Reagent (Bio-Rad), seguindo orientações do fabricante. O homogenato de pulmão foi usado como controle positivo nos ensaios de PLA₂ já que esse tecido possui altos níveis de Prdx6 ¹⁵⁵.

Preparação dos lipossomos unilamelares

Lipídeos usados para produção dos lipossomos unilamelares: 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC) (Sigma-Aldrich P0763); L- α -Phosphatidylcholine (PC) (Sigma-Aldrich P2772); L- α -Phosphatidyl-DL-glycerol ammonium salt (PG) (Sigma-Aldrich P0514); Cholesterol (Sigma-Aldrich C8667). As

soluções estoque foram feitas a partir da diluição dos lipídeos em cloroformo. A proporção dos lipídeos foi: DPPC/ PC/ PG/ colesterol (5 : 2,5 : 1 : 1,5) com [³H] DPPC (American Radiolabeled Chemicals ART 0532). Após a mistura dos lipídeos, eles foram secos em N₂ e ressuspensos em PBS. Em alguns experimentos, o inibidor MJ33 foi adicionado (200 μM). A solução foi submetida a três ciclos de congelamento e descongelamento, alternando N₂ líquido e água quente (50 °C) e posteriormente passada 10 vezes pelo extrusor a 50 °C com membrana de poro 200 μm, utilizando LIPEX™ (Transferra Nanoscience Inc.). Os lipossomos sempre foram preparados no dia do ensaio e armazenados a 4 °C até o início do experimento ⁸⁹.

Preparação de AfPrx1 e AfPrxC

As proteínas recombinantes AfPrx1 e AfPrxC foram obtidas de acordo com as etapas descritas no item “Clonagem, expressão e purificação de Prx6 de *A. fumigatus*” da Parte I desta tese.

Ensaio de PLA₂ com lipossomos

A atividade de PLA₂ foi medida utilizando lipossomos unilamelares. As reações continham Prx (5, 10 ou 50 μM), lipossomos (100 μL) e tampão ácido (acetato de sódio 40 mM, pH 4,0, e EDTA 5 mM) ou neutro (Tris-Cl 50 mM, pH 7,4 e EGTA 1 mM) e foram incubadas a 37 °C por 1 h. A reação foi interrompida pela adição de 3,75 mL de clorofórmio/ metanol (1:2) por pelo menos 1 hora.

A extração dos lipídeos foi realizada com: 1,25 mL de clorofórmio (pelo menos 1 hora), 1,25 mL de água (pelo menos 1 hora), centrifugação 10 min/ 1000 rpm, recuperação da camada de clorofórmio , secagem da amostra em N₂. As amostras foram ressuspensas antes de serem submetidas a cromatografia de camada fina (TLC) de duas etapas: hexano/ dietil éter/ ácido acético (primeira etapa 60 : 40 : 10 e segunda etapa 90 : 10 : 1) (Figura 50). As amostras foram coradas em câmara com atmosfera de iodino após a secagem da placa. Os ácidos graxos livres foram quantificados após extração: adição de 1 mL de água; 12 horas de intervalo; adição de 10 mL de Biodegradable Counting Cocktail (Econo-Safe™ 111175); leitura em cintilador ^{156,157}. A atividade de PLA₂ foi determinada após a medida (cpm) recuperada após 1 h de incubação (subtraindo o tempo zero do controle).

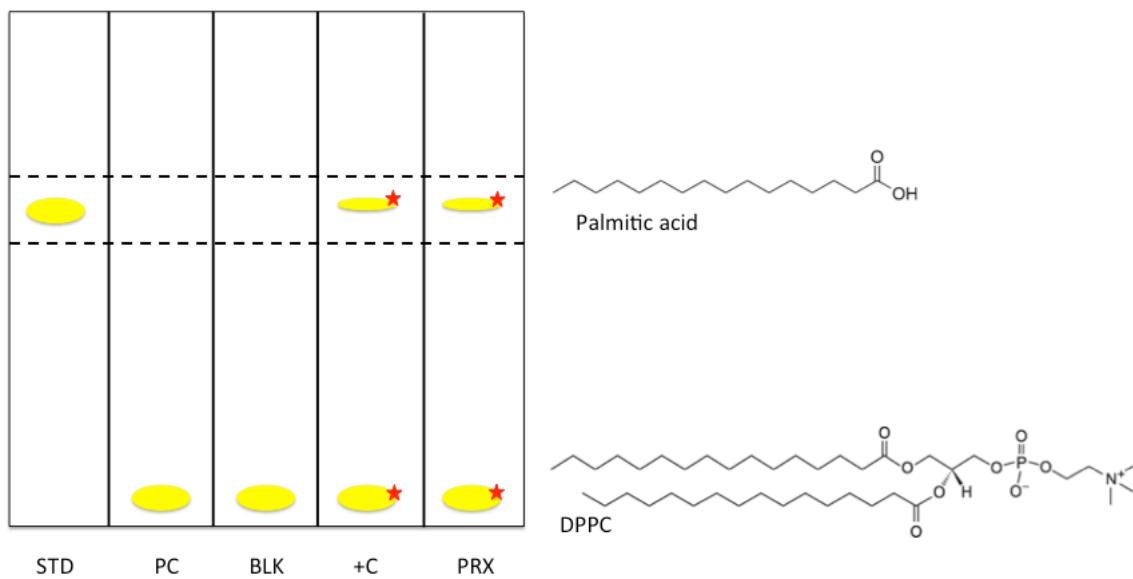


Figura 50 – Esquema da cromatografia de camada fina (TLC) utilizada no ensaio de PLA₂. *Lane 1:* padrão (ácido palmítico) (STD); *lane 2:* Phosphatidylcholine (PC); *lane 3:* branco (somente lipossomo) (BLK); *lane 4:* controle positivo (homogenato de pulmão e lipossomo) (+C); *lane 5:* reação completa (peroxiredoxina e lipossomo) (PRX). As regiões amarelas representam os lipídeos e as estrelas representam a presença de moléculas radioativas. A região entre as linhas tracejadas representam a área que é retirada para análise. As estruturas do lado direito indicam lipídeos representativos nas diferentes partes da placa de TLC.

Fosforilação de AfPrx1 e AfPrxC

Primeiramente, as similaridades e identidades entre as isoformas de quinases humanas disponíveis para compra (MAPK Erk2 e p38 γ) e as quinases de *A. fumigatus* foram analisadas a fim de decidir qual quinase humana seria utilizada para os ensaios de fosforilação *in vitro*. Para tanto, as sequências de Erk2 (GI: 119554) and p38 γ (GI: 6685489) foram alinhadas contra o genoma de *A. fumigatus* utilizando o *software* BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

A fosforilação de AfPrx1 e AfPrxC por Erk2 (Merck Millipore 14-550) foi realizada seguindo os passos: Prx recombinante (150 ng/ μ L), tampão de reação (Tris-Cl 50 mM pH 7,5, EGTA 20 μ M), MgCl₂ 10 mM e ATP 2 mM na presença ou ausência da MAPK ativa (10 ng/ μ L). As reações foram encubadas a 30 °C por 90 min sob leve agitação ^{157,158}. A MAPK foi previamente diluída para 80 ng/ μ L segundo as orientações do fabricante (Tris-Cl 50 mM pH 7,5; EGTA 0,1 mM; Na₃VO₄ 0,1 mM; 2-mercaptopetanol 0,1 %, BSA 1 mg/ mL).

Análise da fosforilação de AfPrx1 e AfPrxC por western blot

Após a reação de fosforilação, as amostras (10 µL) foram reduzidas com 100 mM de DTT e aquecidas a 95 °C por 5 min para análise em SDS-PAGE com gel 12 % (NuPAGE® NP0341) por 50 min a 200 V. O sistema utilizado foi Novex™ NuPAGE® SDS-PAGE Gel System (Thermo Fisher Scientific) com tampão de corrida MOPS SDS (Thermo Fisher Scientific NP0001).

O gel foi transferido utilizando o tampão de transferência NuPAGE® (Thermo Fisher Scientific NP0006), por 90 min a 35 V. A membrana foi corada com Ponceau S para análise das proteínas totais e posteriormente bloqueada por 30 min com tampão de bloqueio Odyssey (Li-Cor® 927-40000). A membrana foi então encubada com o anticorpo primário anti-camundongo P-Prdx6 S3091-1 na diluição 1:200 em mistura de tampão de bloqueio : TBS-T (1 : 4), *overnight* a 4 °C. As lavagens (3 × de 10 min) foram realizadas com TBS-T. Posteriormente a membrana foi encubada com o anticorpo secundário anti-coelho IRDye® 800CW (Li-Cor 925-32211), diluição 1 : 5000 em TBS-T, por 45 min a *RT*. Antes da visualização, a membrana foi lavada 3 × por 10 min com TBS-T. Vale ressaltar que o anticorpo primário utilizado é específico para Prdx6 fosforilada de camundongo e foi produzido utilizando o peptídeo fosforilado contendo a região da treonina 177 (TGTPVApTPVDWKKG) como antígeno¹⁵⁹. Esta região é relativamente diferente se comparada a região de AfPrx1 e de AfPrxC (Figura 51).

***Mus musculus* Prdx6 – TGTPVATPVDWKKG**
***Aspergillus fumigatus* Prx1 – TTDKHGVTCPINWLP**
***Aspergillus fumigatus* PrxC – ADKKGIATPIDWTVG**

Figura 51 – Comparação entre as sequências proteicas da região da treonina conservada nas três Prx6: Prdx6 de camundongo (*Mus musculus*), AfPrx1 e AfPrxC de *A. fumigatus*. A sequência da Prdx6 de camundongo representa o peptídeo fosforilado utilizado como antígeno para a produção do anticorpo utilizado no experimento (anti-camundongo P-Prdx6). A treonina conservada está marcada em vermelho e os resíduos idênticos entre AfPrx1 e/ ou AfPrxC e MmPrdx6 estão marcados em azul. AfPrx1 compartilha apenas 3 resíduos idênticos (20 %) e AfPrxC compartilha 7 (47 %) com MmPrdx6.

Análise da fosforilação de AfPrx1 e AfPrxC por espectrometria de massas

Experimentos realizados pelo Dr. João Silva e Ms. Rogerio Aleixo Silva utilizando o serviço oferecido pelo CEPID Redoxoma. As proteínas foram

fosforiladas como descrito anteriormente no item “Fosforilação de AfPrx1 e AfPrxC”. Posteriormente, as proteínas foram digeridas. Para tanto, foi adicionado 80 µL do tampão bicarbonato de amônio 100 mM pH 8 e uréia 8 M (1:1) e 10 µL de DTT 100 mM em cada amostra para posterior incubação à 30 °C por 1 h e agitação de 500 rpm. Em seguida, foi adicionado 10 µL de iodoacetamina 200 mM e realizada nova incubação a 25 °C por 30 min com agitação de 400 rpm no escuro. Após o término da incubação, foi adicionado 3 µL de Tripsina Gold (Promega) 40 ng/µL (concentração final 1:50) e 540 µL de tampão bicarbonato de amônio 100 mM pH 8 para nova incubação à 37 °C por 16 h e agitação de 400 rpm. A atividade da tripsina foi neutralizada após adição de 6,8 µL de ácido trifluoacético (TFA) (concentração final 0,1 %) e secas em *speed vac* para posterior armazenamento a -20 °C.

Para purificação dos extratos, as amostras foram ressuspensas em 50 µL de solução água ultrapura e 0,1 % de ácido fórmico. Em seguida, cada amostra foi purificada e concentrada através do uso de resina ZipTip (Millipore) de acordo com as informações do fabricante. Posteriormente, as amostras foram secas em *speed vac* e armazenadas a -20 °C para posterior injeção no UPLC-MS-MS (AB-Sciex Triple-TOF 6600).

Resultados e Discussão

Avaliação da atividade de PLA₂ de AfPrx1 e AfPrxC

As proteínas AfPrx1 e AfPrxC de *A. fumigatus* possuem a tríade catalítica para a atividade de PLA₂ conservada (AfPrx1: H30, S36, D141 e AfPrxC: H32, S38, D143). A tríade catalítica para esta atividade é espacialmente separada da tríade catalítica para atividade peroxidásica. De acordo com modelo estrutural de AfPrx1 e AfPrxC, podemos observar que esta característica estrutural é conservada nestas enzimas (Figura 52). Apesar desta atividade só ter sido reportada até o momento para as Prx6 de mamíferos, a presença desta tríade catalítica é amplamente distribuída pelos outros membros desta subfamília¹⁶⁰.

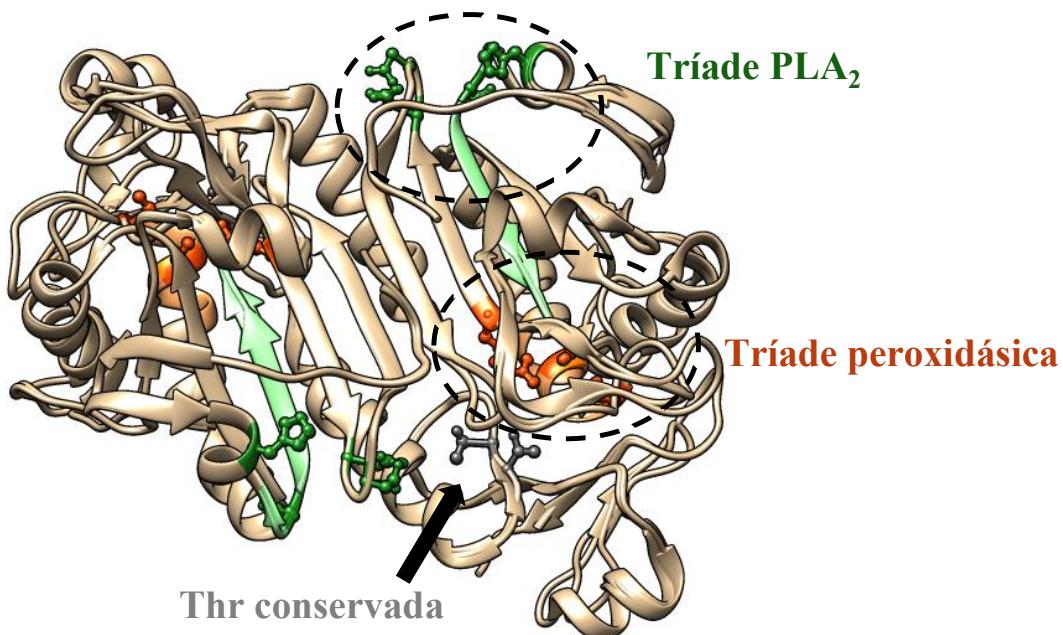


Figura 52 – Sobreposição da estrutura de Prdx6 humana (PDB 5B6M) e dos modelos de AfPrx1 e AfPrxC gerados pelo servidor Swiss-Model (<https://swissmodel.expasy.org>). Estruturas analisadas e visualizadas pelo programa UCSF Chimera (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>). Em verde escuro estão destacados os resíduos da tríade catalítica da atividade de PLA₂ (His, Ser, Asp), em verde claro está a sequência conservada endereçadora lisossomal, em cinza está a treonina conservada, em laranja estão os resíduos da tríade catalítica da atividade peroxidásica (Thr, Cys, Arg).

As atividades de PLA₂ para AfPrx1 e AfPrxC foram medidas utilizando lipossomos unilamelares em dois diferentes pHs (pH 4 e pH 7,4) e na presença ou

ausência do inibidor MJ33. Mr Chandra Dodia me ensinou a realizar o ensaio de PLA₂, Dr Jian-Qin Tao, a preparação dos lipossomos e Dr Jose Vazquez Medina me auxiliou na preparação dos homogenatos de pulmão.

A atividade de PLA₂ de AfPrx1 e AfPrxC foi presente apenas em pH 4, e não em pH 7,4, e é independente de Ca⁺², sendo de aproximadamente 200 nmol/ h/ mg de proteína (Tabela 16). Desta forma, a atividade de fosfolipase que as Prx6 de *A. fumigatus* apresentam é ácida e independente de Ca⁺² (*acidic Ca⁺²-independent phospholipase A₂ - aiPLA₂*)¹⁶¹. Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos com as Prx6 de mamíferos^{161,162}. Vale ressaltar que esta é a primeira vez que a atividade de aiPLA₂ é detectada em uma Prx de não-mamífero.

O trato respiratório humano é coberto por uma camada de surfactante, estrutura lipoprotéica complexa e dinâmica^{163,164}. Sua principal função é diminuir a tensão superficial da interface ar/ líquido dos alvéolos pulmonares, facilitando a respiração e prevenindo o colapso dos alvéolos¹⁶⁵. O surfactante sofre constante remodelamento e as Prx6 de mamíferos são importantes neste processo de reciclagem nos corpos lamelares (organelas ácidas)^{72,89,166}.

Qual seria a possível função desta atividade em *A. fumigatus*? Como dito anteriormente, este fungo coloniza pulmões do hospedeiro, com crescimento inicial nos alvéolos. A camada de surfactante que envolve os alvéolos é rica em fosfolipídeos, principalmente DPPC^{163,164}. Como AfPrx1 e AfPrxC podem hidrolisar esta molécula, é possível que a atividade de PLA₂ destas enzimas pode estar relacionada com o processo de colonização do fungo ao favorecer a invasão através do tecido pulmonar. Esta hidrólise poderia ocorrer dentro de lisossomos, já que estas proteínas possuem sinal de endereçamento para lisossomo e atividade PLA₂ é ácida e independente de Ca⁺² (Figura 9).

Tabela 16 – Atividade específica (nmol/ h/ mg de proteína) para atividade de PLA₂ em diferentes pHs.

AfPrx1	AfPrxC
pH 4	
200,77	191,6
211,21	228,40
220,57	204,28
210,85 ± 8,09	208,09 ± 15,26
pH 7,4	
1,48	2,54
0,72	0,68
1,1 ± 0,38	1,61 ± 0,93

Interferência do inibidor MJ33 na atividade de PLA₂ de AfPrx1 e AfPrxC

Adicionalmente, avaliamos a interferência do inibidor competitivo MJ33 na atividade de aiPLA₂ destas enzimas³⁸ (Figura 53). Os resultados indicam que MJ33 inibe a atividade de aiPLA₂ de AfPrx1 e AfPrxC aproximadamente 75 % (Tabela 17). Esta inibição é similar a obtida em Prx6 de mamíferos (80 %)¹⁶¹.

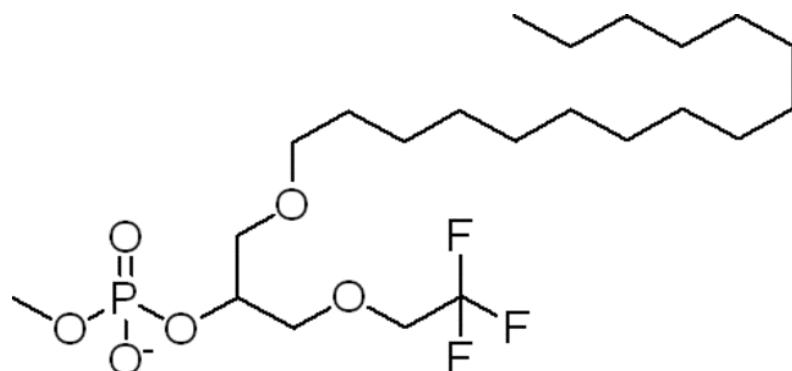


Figura 53 – Estrutura de 1-hexadecyl-3-trifluoroethylglycero-sn-2-phosphomethanol (MJ33), inibidor competitivo da atividade de PLA₂ das Prx.

Tabela 17 – Atividade específica (nmol/ h/ mg de proteína) para atividade de PLA₂ na presença e ausência do inibidor MJ33.

AfPrx1	AfPrxC
pH 4	
- MJ33	
200,77	191,6
211,21	228,40
220,57	204,28
210,85 ± 8,09	208,09 ± 15,26

pH 4 + MJ33	
49,32	53,08
48,31	53,92
54,69	52,8
48,81 ± 0,5	53,5 ± 0,42
% of inhibition	
76,9	74,3

Interferência da fosforilação de AfPrx1 e AfPrxC na atividade de PLA₂

Fosforilação de AfPrx1 e AfPrxC

As duas principais quinases envolvidas na fosforilação de Prx6 são Erk2 e p38 γ ¹⁵⁷. Assim, alinhamentos entre estas quinases humanas e as quinases putativas de *A. fumigatus* foram realizados. Os *matches* com o menor E-value de cada busca foram comparados a fim de determinar qual quinase humana é mais similar às quinases do fungo. O intuito destas análises *in silico* foi aumentar a probabilidade da quinase comercial humana interagir e fosforilar as Prx do fungo.

O resultado estas análises revelou que a Erk2 humana é 59 % idêntica e 73 % similar à quinase MpkB de *A. fumigatus*. Por outro lado, a quinase humana p38 γ é 50 % idêntica e 69 % similar à quinase SakA do fungo (Figura 54). Desta forma, a quinase Erk2 foi escolhida para utilização nos experimentos de fosforilação de AfPrx1 e AfPrxC.

A

Download GenPept Graphics

MAP kinase MpkB [Aspergillus fumigatus Af293]

Sequence ID: XP_751160_1 Length: 353 Number of Matches: 1

► See 1 more title(s)

Range 1: 11 to 353 GenPept Graphics

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
397 bits(1020)	7e-139	Compositional matrix adjust.	204/343(59%)	251/343(73%)	4/343(1%)
Query 15	RQGVFDIVGPRYIINLNSYIGEAGYGMVCSAYDNVNKV/RVAIKKISPFHENQTYCQRTILREIKI	74			
R F+V +Y	I GEGAYG-VCSA	+ +VAIKKI+PF+H +C RILRE+E+			
Sbjct 11	RKISFNVSEQYEIQDVGIVGEAYGVVCSAIHKPSQQVKAIIKITPFDNSMFCLRLTREMKL	70			
Query 75	LLRFRHENIIGINDIIAPTIIEQNMKV/YIVQDLMEHDLYKLLWKTQHLSNDMHCYFLYQIL	134			
L F HENII I DI R E	+VY++Q+LMETD+++++TQ	LS+DH YF+YQ L			
Sbjct 71	LRYFNHNENIISILDIQQRPRNYESFNEVYLIQEIMETDMHRVIRITQDLSDDOHQCQYFIYQIL	130			
Query 135	RGLKYIHSANVLRLDKPSNLLNNTCDLKICDFGLARVADPDHDHTGFLTEYVVAIRWYR	194			
R LK +HSANVLRLDKPSNLLLN	CDLK-CDFGLAR A	D+GF+TEYVATRWYR			
Sbjct 131	RALKAMHSANVLRLDKPSNLLNANCDLKVCDFGLARSAASTDNNSGFMTEYVVAIRWYR	190			
Query 195	APEIMLNSKGTYKTSIDIWSVGCILAEMLSNRPIFFPGKHYLDQLNNHILGILGSPSQEDLNC	254			
APEIML K YT+ID-WSVGCGILAEMLS	+P+FGK Y QL IL	+LG+F+ ED			
Sbjct 191	APEIMLTFKEYTIAIDUWSVGCILAEMLSGPKLPFGKDQVHHQLTLILUDVLGTPTMEDYYG	250			
Query 255	IINLKARNYLLSLPHMNKVPWNRLFPNADSKALDLDKMLTFNPMPKRIEVEQALAHPYLE	314			
I + +AR Y+ SLP K K+P+ LFP ++ ALDLL+K+L FNU KRI VE+AL HPYLE					
Sbjct 251	IKSRRAREYIRSLPFKKKIPFKALFPKSNELALDLLEKLLAFNPAKRITVEEALRHPYLE	310			
Query 315	QYYDPSDEPIA----EAPFKFTDMELDDLPEKEKLKELIFEETIAR	353			
Q+DP DEF A E F FD D L RE+LK LI+EE R					
Sbjct 311	PYHDPDDEPTAPPPIPEGFFDFDGNKDALSKEQQLKTLIYEEIMR	353			

B

Download GenPept Graphics

MAP kinase SakA [Aspergillus fumigatus Af293]

Sequence ID: XP_752664_1 Length: 366 Number of Matches: 1

► See 2 more title(s)

Range 1: 4 to 340 GenPept Graphics

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
369 bits(947)	1e-127	Compositional matrix adjust.	170/342(50%)	236/342(69%)	6/342(1%)
Query 11	FYRQEVIKTAWEVRAVYRDLOQFVGSGAYGAVCSAVDGRIGAKVAIKKLYRPFQSELFAKR	70			
F R ++ I +E+ + Y DLQFVG GA+G VCSA D TG VA+KK+ +PF + + +KR					
Sbjct 4	FVRAQIFGTITEITSRYIDLQFVGGMAGFLVCSARDQTLGPVAVKPKIMKFSTFVLSKSR	63			
Query 71	AYRELRLKKHMRHENHVGLLWDVFTPDETLDDFTDFYLVMPFMGTDLGKLMKHEKLGEDRI	130			
YREL+LLKH+RHEN+I L D+F + D Y V +GTDL+L+ L + I					
Sbjct 64	TYRELKLLKHLRHENIISLSDIF-----ISPLEDIFYVTTELLGTDLHRLLTSRPLEKQFI	118			
Query 131	QFLVYQMLKGRLRYIHAAGIIHSDLKPGNLLAVNEDCELKILDFGLARQADSEMTGYVVIRW	190			
Q+ +YQ+L+GL+Y+H+AG+HRDLK P+N+ +NE+C+LKI DFGLAR D +MTGVV TR+					
Sbjct 119	QFLVYQILRGLKVVHSAGVYHSDLKPGNLINLENCDLKICDFGLARIQDPQMIGVYSTRY	178			
Query 191	YRAPEVILNWMMRYQTVDIWSVGCIMAEMITGKTLFKGSDDHLDQIKEIMKVKTGTPPAEFV	250			
YRAPE++L W +Y VDIWS GCI AEM+ GK LF G DH++Q I ++ GTPP + +					
Sbjct 179	YRAPEIMLTWQKYDVDEVIDNSAGCIFAEMLEGKPLFFGKDHNQFSIIITELLGTPPDDVI	238			
Query 251	QRLQSDEAKNYMMGKLPPELEKKDFPASILTNASPLAVNLLEMLVLDAEQRVITAGEALAHPY	310			
Q + S+ ++K LP+ E++ A+ NA F AV+LLE-MLV D +R+ AGEALAH Y					
Sbjct 239	QTCISENTLRFVKSLLPKERQPLANKFKNADPEAVDLLEMRVLPDKKIRAGEALAHY	298			
Query 311	FESLHDTEDEPQV-QKYDDSFIDVDRTLDENKRVTVIKEYLHF	351			
HD DEP+ +K+D SF+D D +D WK + Y E+L F					
Sbjct 299	LSPYHDPTDEPEAEKFDWSFNADLPVDTWKIMMSYIILDF	340			

Figura 54 – Sequências das quinases humanas Erk2 (GI: 119554) e p38 γ (GI: 6685489) foram alinhadas contra o genoma de *A. fumigatus* utilizando o software *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Erk2 é 59 % idêntica e 73 % similar à quinase MpkB de *A. fumigatus*. Por outro lado, p38 γ é 50 % idêntica e 69 % similar à quinase SakA de *A. fumigatus*.

A possível fosforilação de AfPrx1 e AfPrxC foi avaliada por dois métodos: *western blot* e espectrometria de massas.

A avaliação por *western blot* foi realizada, como descrito em Materiais e Métodos, utilizando o anticorpo específico para a Prdx6 ortóloga de *M. musculus*. As

Prx do fungo são bem diferentes se comparadas com a Prdx6 de camundongo, sendo que AfPrx1 possui apenas 20 % e AfPrxC 47 % de resíduos idênticos na região da Thr fosforilável (Figura 50).

Nas condições analisadas, apenas a AfPrxC foi claramente fosforilada por Erk2 (Figura 55). Postulamos três possibilidades envolvendo o resultado negativo da fosforilação de AfPrx1: o anticorpo contra a proteína de camundongo não reagiu com AfPrx1 visto que estas proteínas só compartilham 20 % dos resíduos próximos à Thr; AfPrx1 não pode ser fosforilada pela Erk2 pois a enzima humana não a reconhece; ou que AfPrx1 não é fosforilável por nenhuma quinase.

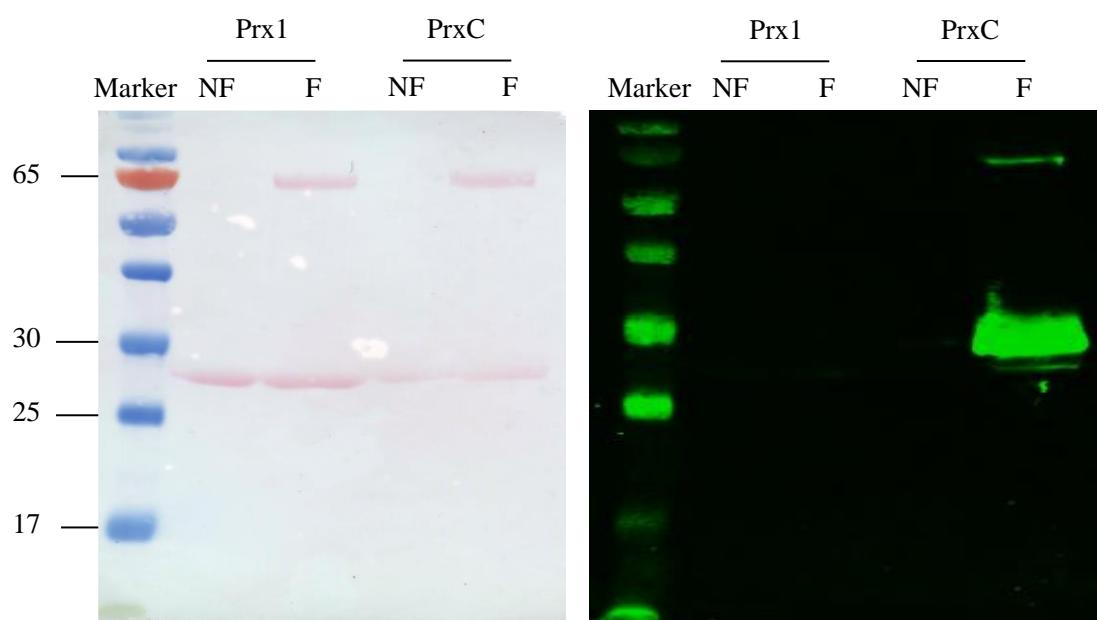


Figura 55 – Fosforilação *in vitro* das proteínas recombinantes AfPrx1 e AfPrxC de *A. fumigatus*. Painel da esquerda representa o resultado da coloração das proteínas totais com Ponceau S e o painel da direita representa o resultado do *western blot* anti-MmPrdx6 fosforilada. *Lane 2:* AfPrx1 não fosforilada; *lane 3:* AfPrx1 fosforilada; *lane 4:* AfPrxC não fosforilada; *lane 5:* AfPrxC fosforilada. As bandas inferiores de aproximadamente 25 kDa representam as Prx, e as bandas superiores correspondem à enzima Erk2.

Tendo em vista esta dúvida em relação ao funcionamento do anticorpo primário utilizado, buscamos avaliar a fosforilação de AfPrx1 e AfPrxC por Erk2 através de espectrometria de massas. De acordo com os resultados obtidos, novamente apenas AfPrxC foi fosforilada. Desta forma, ensaios adicionais precisam ser realizados a fim de verificar se AfPrx1 é passível de fosforilação.

Atividade de PLA₂ após fosforilação de AfPrx1 e AfPrxC

As Prdx6 de mamíferos podem ser fosforiladas pelas MAPK na Thr 177. Esta fosforilação aumenta a atividade de PLA₂ ácida e independente de Ca⁺² em aproximadamente 15 vezes. Adicionalmente, estas Prx passam a apresentar a atividade de PLA₂ em pH neutro ¹⁵⁷. Esta fosforilação implica na translocação desta proteína para a membrana plasmática, onde interage com p67^{phox} (componente da NADPH oxidase 2 – NOX2) e atua na regulação da ativação de NOX2 ¹⁶⁷.

Desta forma, verificamos se a reação de fosforilação com AfPrx1 e AfPrxC causaria alguma alteração na atividade de PLA₂. De acordo com os resultados obtidos, tanto AfPrx1 quanto AfPrxC aumentaram a atividade PLA₂, tanto em pH ácido quanto em pH fisiológico. Este resultado nos surpreendeu com relação à proteína AfPrx1, já que não havíamos detectado a fosforilação de sua Thr por *western blot* e por espectrometria de massas (Tabela 18). Possivelmente, o anticorpo para fosforilação não reconheceu a sequência de AfPrx1 sujeita a fosforilação.

Tabela 18 – Atividade específica (nmol/ min/ mg de proteína) para atividade de PLA₂ antes e após tratamento com a quinase Erk2.

Proteína	Atividade (nmol/ min/ mg)	
	pH 4	pH 7,4
AfPrx1	6,09 ± 0,1	0,7 ± 0,2
AfPrx1 fosforilada	21,85 ± 0,5	20,96 ± 0,3
AfPrxC	4,91 ± 0,1	0,5 ± 0,01
AfPrxC fosforilada	18,69 ± 0,2	18,47 ± 0,1

Estes resultados nos levam a crer que a atividade de PLA₂ presente nas Prdx6 de mamífero, bem como sua prevalência em pH ácido, inibição por MJ33 ou aumento após a fosforilação, se mantêm conservadas em Prx6 de outros grupos, como demonstrado neste trabalho para o fungo *A. fumigatus*. O papel ou papéis fisiológicos que esta atividade pode exercer em fungos ou em outros táxons que também possuam Prx6 com atividade de PLA₂ ainda necessitam ser esclarecidos.

Conclusões

- *A. fumigatus* possui ao menos duas Prx da subfamília Prx6: AfPrx1 e AfPrxC;
- AfPrx1 é citoplasmática e AfPrxC é mitocondrial;
- Com relação à estrutura primária e atividade peroxidásica: AfPrx1 e AfPrxC possuem a tríade catalítica para atividade peroxidásica (T, C e R), o motivo universal das Prx (PxxxTxxS) e o motivo das Prx6 (PVCTTE);
- Com relação à estrutura primária e atividade PLA₂: AfPrx1 e AfPrxC apresentam a tríade catalítica para atividade de PLA₂ (H, S, D), provável peptídeo endereçador lisossomal e T fosforilável conservada;
- AfPrx1 e AfPrxC foram clonadas, expressas e purificadas com alto grau de pureza. AfPrxC somente é expressa sem pré-sequência mitocondrial;
- AfPrx1 e AfPrxC são proteínas diméricas independente de concentração e estado redox;
- AfPrx1 e AfPrxC reduzem de maneira eficiente os seguintes peróxidos: H₂O₂; *t*-BOOH; CuOOH; LAOOH e ONOO⁻;
- AfPrxC é mais reativa com peróxidos orgânicos se comparada com AfPrx1, principalmente com LAOOH. Essa característica pode estar relacionada com a superfície hidrofóbica desta enzima na região do sítio ativo;
- Ao acompanhar a fluorescência intrínseca destas proteínas nos ensaios de oxidação, é possível notar pelo menos duas fases de reação. A primeira é muito rápida e representa a oxidação da Cys peroxidásica a ácido sulfênico (C-SOH). A segunda fase é independente da concentração do peróxido quando este encontra-se em baixas doses e é dependente quando em doses mais altas. Para os casos de dependência, assumimos que a reação se tratava da superoxidação proteica.
- Através de medidas eletroquímicas em micélio de *A. fumigatus* (linhagens wt, ΔAfPrx1 e ΔAfPrx1:: ΔAfPrx1⁺), pudemos atestar a grande importância de AfPrx1 na detoxificação de H₂O₂ exógeno. Apesar de incapaz de restaurar os níveis basais de H₂O₂, ΔAfPrx1 manteve-se viável após o tratamento com o peróxido;

- Todos os fungos *knockouts* simples as Prx6 de *A. fumigatus* sobrevivem significativamente menos após interação com macrófagos quando comparados com as linhagens wt e complementares;
- Dentre todos os sistemas redutores testados (sistema Trx, sistema Trx + GSH, sistema Grx, ascorbato, ergotioneína, GSH e H₂S), apenas o H₂S foi capaz de reduzir as proteínas de maneira eficiente ($k_{AfPrx1} \approx 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ e $k_{AfPrxC} \approx 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$);
- *A. fumigatus* provavelmente sintetiza D-eritroascorbato (análogo de ascorbato). A concentração intracelular desta molécula é de aproximadamente 200 μM;
- AfPrx1 e AfPrxC possuem atividade de PLA₂ ácida (pH 4) e independente de Ca⁺² (aiPLA₂) de aproximadamente 200 nmol/ h/ mg de proteína;
- A atividade de PLA₂ é inibida pelo inibidor competitivo MJ33 em aproximadamente 75 %;
- AfPrxC é fosforilada por Erk2 e esta fosforilação aumenta a atividade de PLA₂, tanto em pH 4 quanto em pH 7,4;
- Apesar de não termos detectado a fosforilação em AfPrx1, após seu tratamento com Erk2 esta proteína também teve sua atividade de PLA₂ aumentada em pH 4 e pH 7,4.

Referências

1. Rhee, S. G., Chae, H. Z. & Kim, K. Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic. Biol. Med.* **38**, 1543–52 (2005).
2. Eppig, J. J. & Pyle, A. D. Peroxiredoxin Evolution and the Signaling. **300**, 650–653 (2003).
3. Netto, L. E. S., Chae, H. Z., Kang, S., Rhee, S. G. & Stadtman, E. R. Removal of Hydrogen Peroxide by Thiol-specific Antioxidant Enzyme (TSA) Is Involved with Its Antioxidant Properties. *J. Biol. Chem.* **271**, 15315–15321 (1996).
4. Hall, A., Karplus, P. A. & Poole, L. B. Typical 2-Cys Peroxiredoxins: Structures, mechanisms and functions. *FEBS J* **276**, 2469–2477 (2009).
5. Chae, H. Z., Chung, S. J. & Rhee, S. G. Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. *J. Biol. Chem.* **269**, 27670–8 (1994).
6. Bryk, R., Griffin, P. & Nathan, C. Peroxynitrite reductase activity of bacterial peroxiredoxins. *Nature* **407**, 211–5 (2000).
7. Kang, S. W., Rhee, S. G., Chang, T.-S., Jeong, W. & Choi, M. H. 2-Cys peroxiredoxin function in intracellular signal transduction: therapeutic implications. *Trends Mol. Med.* **11**, 571–8 (2005).
8. Brown, J. D. *et al.* A peroxiredoxin promotes H₂O₂ signaling and oxidative stress resistance by oxidizing a thioredoxin family protein. *Cell Rep.* **5**, 1425–35 (2013).
9. Zhang, M. *et al.* Induction of Peroxiredoxin 1 by Hypoxia Regulates Heme Oxygenase-1 via NF-κB in Oral Cancer. *PLoS One* **9**, e105994 (2014).
10. Barranco-Medina, S., Lázaro, J.-J. & Dietz, K.-J. The oligomeric conformation of peroxiredoxins links redox state to function. *FEBS Lett.* **583**, 1809–16 (2009).
11. Nelson, K. J. *et al.* Analysis of the peroxiredoxin family: using active site structure and sequence information for global classification and residue analysis. *Proteins* **79**, 947–964 (2011).
12. Copley, S. D., Novak, W. R. P. & Babbitt, P. C. Divergence of function in the thioredoxin fold superfamily: evidence for evolution of peroxiredoxins from a thioredoxin-like ancestor. *Biochemistry* **43**, 13981–95 (2004).
13. Soito, L. *et al.* PREX: PeroxiRedoxin classification indEX, a database of subfamily assignments across the diverse peroxiredoxin family. *Nucleic Acids Res.* **39**, D332–7 (2011).
14. Wood, Z. a, Schröder, E., Robin Harris, J. & Poole, L. B. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 32–40 (2003).

15. Monteiro, G., Horta, B. B., Pimenta, D. C., Augusto, O. & Netto, L. E. S. Reduction of 1-Cys peroxiredoxins by ascorbate changes the thiol-specific antioxidant paradigm, revealing another function of vitamin C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 4886–91 (2007).
16. Djuika, C. F. *et al.* Plasmodium falciparum antioxidant protein as a model enzyme for a special class of glutaredoxin/glutathione-dependent peroxiredoxins. *Biochim. Biophys. Acta* **1830**, 4073–90 (2013).
17. Pedrajas, J. R., Padilla, C. A., McDonagh, B. & Bárcena, J. A. Glutaredoxin participates in the reduction of peroxides by the mitochondrial 1-CYS peroxiredoxin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antioxid. Redox Signal.* **13**, 249–58 (2010).
18. Deponte, M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* **1830**, 3217–66 (2013).
19. Ralat, L. a, Manevich, Y., Fisher, A. B. & Colman, R. F. Direct evidence for the formation of a complex between 1-cysteine peroxiredoxin and glutathione S-transferase pi with activity changes in both enzymes. *Biochemistry* **45**, 360–72 (2006).
20. Manevich, Y., Feinstein, S. I. & Fisher, a B. Activation of the antioxidant enzyme 1-CYS peroxiredoxin requires glutathionylation mediated by heterodimerization with pi GST. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 3780–5 (2004).
21. Pedrajas, J. R. *et al.* Glutathione Is the Resolving Thiol for Thioredoxin Peroxidase Activity of 1-Cys Peroxiredoxin Without Being Consumed During the Catalytic Cycle. *Antioxid. Redox Signal.* 150819074011003 (2015). doi:10.1089/ars.2015.6366
22. Tairum, C. a, de Oliveira, M. a, Horta, B. B., Zara, F. J. & Netto, L. E. S. Disulfide Biochemistry in 2-Cys Peroxiredoxin: Requirement of Glu50 and Arg146 for the Reduction of Yeast Tsa1 by Thioredoxin. *J. Mol. Biol.* **424**, 28–41 (2012).
23. Winterbourn, C. C. & Metodiewa, D. Reactivity of biologically important thiol compounds with superoxide and hydrogen peroxide. *Free Radic. Biol. Med.* **27**, 322–328 (1999).
24. Flohe, L. A Comparison of Thiol Peroxidase Mechanisms. *Antioxid. Redox Signal.* **15**, 763–780 (2011).
25. Hall, A., Parsonage, D., Poole, L. B. & Karplus, P. A. Structural evidence that peroxiredoxin catalytic power is based on transition-state stabilization. *J. Mol. Biol.* **402**, 194–209 (2010).
26. Park, S. G., Cha, M. K., Jeong, W. & Kim, I. H. Distinct physiological functions of thiol peroxidase isoenzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **275**, 5723–32 (2000).
27. Kitano, K., Niimura, Y., Nishiyama, Y. & Miki, K. Stimulation of peroxidase activity by decamerization related to ionic strength: AhpC protein from *Amphibacillus*

- xylanus. *J. Biochem.* **126**, 313–319 (1999).
- 28. Morais, M. A. B. *et al.* How pH modulates the dimer-decamer interconversion of 2-cys peroxiredoxins from the Prx1 subfamily. *J. Biol. Chem.* **290**, 8582–8590 (2015).
 - 29. Demasi, A. P. D., Pereira, G. a G. & Netto, L. E. S. Yeast oxidative stress response. Influences of cytosolic thioredoxin peroxidase I and of the mitochondrial functional state. *FEBS J.* **273**, 805–16 (2006).
 - 30. Parsonage, D. *et al.* Analysis of the link between enzymatic activity and oligomeric state in AhpC, a bacterial peroxiredoxin. *Biochemistry* **44**, 10583–10592 (2005).
 - 31. Jang, H. H. *et al.* Two enzymes in one; two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function. *Cell* **117**, 625–35 (2004).
 - 32. Lowther, W. T. & Haynes, A. C. Reduction of Cysteine Sulfinic Acid in Eukaryotic, Typical 2-Cys Peroxiredoxins by Sulfiredoxin. 99–109 (2011).
 - 33. Biteau, B., Labarre, J. & Toledano, Michael, B. ATP-dependent reduction of cysteine – sulphenic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. *Nature* **425**, 980–984 (2003).
 - 34. Jeffery, C. J. Moonlighting proteins--an update. *Mol. Biosyst.* **5**, 345–50 (2009).
 - 35. Fisher, A. B. Peroxiredoxin 6: a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A₂ activities. *Antioxid. Redox Signal.* **15**, 831–44 (2011).
 - 36. Chen, J. W., Dodia, C., Feinstein, S. I., Jain, M. K. & Fisher, A. B. 1-Cys peroxiredoxin, a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A2 activities. *J. Biol. Chem.* **275**, 28421–7 (2000).
 - 37. Oláhová, M. *et al.* A redox-sensitive peroxiredoxin that is important for longevity has tissue- and stress-specific roles in stress resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 19839–44 (2008).
 - 38. Lien, Y.-C., Feinstein, S. I., Dodia, C. & Fisher, A. B. The roles of peroxidase and phospholipase A2 activities of peroxiredoxin 6 in protecting pulmonary microvascular endothelial cells against peroxidative stress. *Antioxid. Redox Signal.* **16**, 440–51 (2012).
 - 39. Slauch, J. M. How does the oxidative burst of macrophages kill bacteria? Still an open question. *Mol. Microbiol.* **80**, 580–583 (2011).
 - 40. Flannagan, R. S., Cosío, G. & Grinstein, S. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 355–66 (2009).
 - 41. Wojtaszek, P. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem. J.* **322**, 681–692 (1997).
 - 42. Beavers, W. N. & Skaar, E. P. Neutrophil-generated oxidative stress and protein damage in *Staphylococcus aureus*. *Pathog. Dis.* **74**, 1–15 (2016).
 - 43. Liebert, M. A., Nickel, C., Rahlf, S., Deponte, M. & Cells, R. E. D. B. Thioredoxin

- Networks in the Malarial Parasite *Plasmodium falciparum*. *Antioxid. Redox Signal.* **8**, 1227–1239 (2006).
44. Gretes, M. C., Poole, L. B. & Karplus, P. A. Peroxiredoxins in parasites. *Antioxid. Redox Signal.* **17**, 608–33 (2012).
 45. Jaeger, T. & Flohé, L. The thiol-based redox networks of pathogens: unexploited targets in the search for new drugs. *BioFactors* **27**, 109–20 (2006).
 46. Flannagan, R. S., Cosío, G. & Grinstein, S. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 355–366 (2009).
 47. Piñeyro, M. D., Parodi-Talice, A., Arcari, T. & Robello, C. Peroxiredoxins from *Trypanosoma cruzi*: virulence factors and drug targets for treatment of Chagas disease? *Gene* **408**, 45–50 (2008).
 48. Hébrard, M., Viala, J. P. M., Méresse, S., Barras, Frédéric, B. & Aussel, L. Redundant Hydrogen Peroxide Scavengers Contribute to *Salmonella* Virulence and Oxidative Stress Resistance. *J. Bacteriol.* **191**, 4605–4614 (2009).
 49. Manca, C., Paul, S., Barry, C. E., Freedman, V. H. & Kaplan, G. *Mycobacterium tuberculosis* catalase and peroxidase activities and resistance to oxidative killing in human monocytes in vitro. *Infect. Immun.* **67**, 74–79 (1999).
 50. Hillmann, F. *et al.* The Crystal Structure of Peroxiredoxin Asp f3 Provides Mechanistic Insight into Oxidative Stress Resistance and Virulence of *Aspergillus fumigatus*. *Sci. Rep.* **6**, 33396 (2016).
 51. Kaihami, G. H. *et al.* Involvement of a 1-Cys Peroxiredoxin in Bacterial Virulence. *PLoS Pathog.* **10**, (2014).
 52. Encheva, V., Wait, R., Gharbia, S. E., Begum, S. & Shah, H. N. Proteome analysis of serovars Typhimurium and Pullorum of *Salmonella enterica* subspecies I. *BMC Microbiol.* **5**, 1–10 (2005).
 53. Iwasaki, M. *et al.* One-Dimensional Capillary Liquid Chromatographic Separation Coupled with Tandem Mass Spectrometry Unveils the *Escherichia coli* Proteome on a Microarray Scale. *Anal. Chem.* **82**, 2616–2620 (2010).
 54. Horta, B. B., Oliveira, M. A. De, Discola, K. F., Cussiol, J. R. R. & Netto, L. E. S. Structural and biochemical characterization of peroxiredoxin Qb from *Xylella fastidiosa*. *J. Biol. Chem.* 16051–16065 (2010).
 55. Oliveira, M. a *et al.* Structural insights into enzyme-substrate interaction and characterization of enzymatic intermediates of organic hydroperoxide resistance protein from *Xylella fastidiosa*. *J. Mol. Biol.* **359**, 433–45 (2006).
 56. Farha, M. a & Brown, E. D. Discovery of antibiotic adjuvants. *Nat. Biotechnol.* **31**, 120–2 (2013).
 57. Hassett, D. J. & Imlay, J. A. Bacterial Antibiotics and Oxidative Stress: A Radical

- Proposal. *ACS Chem. Biol.* **2**, 708–710 (2007).
- 58. Dagenais, T. R. T. & Keller, N. P. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **22**, 447–65 (2009).
 - 59. Reichenberger, F., Habicht, J. M., Gratwohl, A. & Tamm, M. Diagnosis and treatment of invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic patients. *Eur. Respir. J.* **19**, 743–755 (2002).
 - 60. Lessing, F. *et al.* The *Aspergillus fumigatus* Transcriptional Regulator AfYap1 Represents the Major Regulator for Defense against Reactive Oxygen Intermediates but Is Dispensable for Pathogenicity in an Intranasal Mouse Infection Model †. *Eukaryot. Cell* **6**, 2290–2302 (2007).
 - 61. Latgé, J.-P. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**, 310–350 (1999).
 - 62. Morton, C. O., Bouzani, M., Loeffler, J. & Rogers, T. R. Direct interaction studies between *Aspergillus fumigatus* and human immune cells; what have we learned about pathogenicity and host immunity? *Front. Microbiol.* **3**, 1–7 (2012).
 - 63. Vinh, D. C. Insights into human antifungal immunity from primary immunodeficiencies. *Lancet Infect. Dis.* **11**, 780–792 (2011).
 - 64. Heinekamp, T. *et al.* Interference of *Aspergillus fumigatus* with the immune response. *Semin. Immunopathol.* **37**, 141–152 (2015).
 - 65. Denning, D. W. Invasive Aspergillosis. *CID* 781–803 (1998).
 - 66. Albrecht, D., Guthke, R., Brakhage, A. a & Kniemeyer, O. Integrative analysis of the heat shock response in *Aspergillus fumigatus*. *BMC Genomics* **11**, 32 (2010).
 - 67. Dasbach, E. J. Burden of Aspergillosis-Related Hospitalizations in the United States. *Clin. Infect. Dis.* **31**, 1524–1528 (2000).
 - 68. Choi, J. *et al.* fPoxDB: fungal peroxidase database for comparative genomics. *BMC Microbiol.* **14**, 117 (2014).
 - 69. Horton, P. *et al.* WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acids Res.* **35**, W585–W587 (2007).
 - 70. Fukasawa, Y. *et al.* MitoFates: Improved Prediction of Mitochondrial Targeting Sequences and Their Cleavage Sites. *Mol. Cell. Proteomics* **14**, 1113–1126 (2015).
 - 71. Rawlings, N. D., Waller, M., Barrett, a. J. & Bateman, a. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res.* **42**, D503–D509 (2014).
 - 72. Sorokina, E. M., Feinstein, S. I., Milovanova, T. N. & Fisher, A. B. Identification of the amino acid sequence that targets peroxiredoxin 6 to lysosome-like structures of lung epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **297**, L871–80 (2009).
 - 73. Waterhouse, A. *et al.* SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and

- complexes. *Nucleic Acids Res.* **46**, W296–W303 (2018).
- 74. Semenyuk, A. V. & Svergun, D. I. GNOM. A program package for small-angle scattering data processing. *J. Appl. Crystallogr.* **24**, 537–540 (1991).
 - 75. Svergun, D., Barberato, C. & Koch, M. H. CRYSTOL - A program to evaluate X-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates. *J. Appl. Crystallogr.* **28**, 768–773 (1995).
 - 76. Petoukhov, M. V. *et al.* New developments in the ATSAS program package for small-angle scattering data analysis. *J. Appl. Crystallogr.* **45**, 342–350 (2012).
 - 77. Toledo, J. C. *et al.* Horseradish peroxidase compound I as a tool to investigate reactive protein-cysteine residues: from quantification to kinetics. *Free Radic. Biol. Med.* **50**, 1032–8 (2011).
 - 78. Ogușcu, R., Rettori, D., Munhoz, D. C., Netto, L. E. S. & Augusto, O. Reactions of yeast thioredoxin peroxidases I and II with hydrogen peroxide and peroxy nitrite: rate constants by competitive kinetics. *Free Radic. Biol. Med.* **42**, 326–34 (2007).
 - 79. Miyamoto, S., Martinez, G. R., Martins, A. P. B., Medeiros, M. H. G. & Di Mascio, P. Direct evidence of singlet molecular oxygen [O₂ (1Δg)] production in the reaction of linoleic acid hydroperoxide with peroxy nitrite. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 4510–4517 (2003).
 - 80. Radil, R., Beckman, J. S., Bush, K. M. & Freeman, B. a. Peroxynitrite Oxidation of Sulfhydryls. *J. Biol. Chem.* **266**, 4244–4250 (1991).
 - 81. Trujillo, M. *et al.* Trypanosoma brucei and Trypanosoma cruzi tryparedoxin peroxidases catalytically detoxify peroxy nitrite via oxidation of fast reacting thiols. *J. Biol. Chem.* **279**, 34175–34182 (2004).
 - 82. Santos, C. S. *et al.* Monitoring H₂O₂ inside Aspergillus fumigatus with an integrated microelectrode: the role of peroxiredoxin protein Prx1. *Anal. Chem. acs.analchem.7b04074* (2018). doi:10.1021/acs.analchem.7b04074
 - 83. Käfer Etta. in *Advances in Genetics* 33–131 (1977).
 - 84. Rampersad, S. N. Multiple applications of alamar blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors (Switzerland)* **12**, 12347–12360 (2012).
 - 85. Repp, K. K., Menor, S. A. & Pettit, R. K. Microplate Alamar blue assay for susceptibility testing of Candida albicans biofilms. *Med. Mycol.* **45**, 603–607 (2007).
 - 86. Meletiadis, J. *et al.* Colorimetric assay for antifungal susceptibility testing of Aspergillus species. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 3402–8 (2001).
 - 87. Nelson, K. J. *et al.* Analysis of the peroxiredoxin family: using active-site structure and sequence information for global classification and residue analysis. *Proteins* **79**, 947–64 (2011).

88. Nevalainen, T. J. 1-Cysteine peroxiredoxin: A dual-function enzyme with peroxidase and acidic Ca²⁺-independent phospholipase A2 activities. *Biochimie* **92**, 638–644 (2010).
89. Chatterjee, S. *et al.* Peroxiredoxin 6 phosphorylation and subsequent phospholipase A2 activity are required for agonist-mediated activation of NADPH oxidase in mouse pulmonary microvascular endothelium and alveolar macrophages. *J. Biol. Chem.* **286**, 11696–706 (2011).
90. Albrecht, D., Guthke, R., Brakhage, A. a & Kniemeyer, O. Integrative analysis of the heat shock response in *Aspergillus fumigatus*. *BMC Genomics* **11**, 32 (2010).
91. Barker, B. M. *et al.* Transcriptomic and proteomic analyses of the *Aspergillus fumigatus* hypoxia response using an oxygen-controlled fermenter. *BMC Genomics* **13**, 62 (2012).
92. Cagas, S. E., Jain, M. R., Li, H. & Perlin, D. S. The Proteomic Signature of *Aspergillus fumigatus* During Early Development. *Mol. Cell. Proteomics* **10**, M111.010108 (2011).
93. Cagas, S. E., Jain, M. R., Li, H. & Perlin, D. S. Profiling the *Aspergillus fumigatus* proteome in response to caspofungin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 146–154 (2011).
94. da Silva Ferreira, M. E. *et al.* Transcriptome analysis of *Aspergillus fumigatus* exposed to voriconazole. *Curr. Genet.* **50**, 32–44 (2006).
95. Gautam, P. *et al.* Proteomic and transcriptomic analysis of *Aspergillus fumigatus* on exposure to amphotericin B. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 4220–4227 (2008).
96. Gautam, P. *et al.* Transcriptomic and Proteomic Profile of *Aspergillus fumigatus* on Exposure to Artemisinin. *Mycopathologia* **172**, 331–346 (2011).
97. Hagag, S. *et al.* Transcriptional and proteomic analysis of the *aspergillus fumigatus* δprt protease-deficient mutant. *PLoS One* **7**, (2012).
98. Kniemeyer, O., Lessing, F. & Brakhage, A. a. Proteome analysis for pathogenicity and new diagnostic markers for *Aspergillus fumigatus*. *Med. Mycol.* **47**, S248–54 (2009).
99. Lessing, F. *et al.* The *Aspergillus fumigatus* transcriptional regulator AfYap1 represents the major regulator for defense against reactive oxygen intermediates but is dispensable for pathogenicity in an intranasal mouse infection model. *Eukaryot. Cell* **6**, 2290–302 (2007).
100. Ouyang, H., Luo, Y., Zhang, L., Li, Y. & Jin, C. Proteome analysis of *Aspergillus fumigatus* total membrane proteins identifies proteins associated with the glycoconjugates and cell wall biosynthesis using 2D LC-MS/MS. *Mol. Biotechnol.* **44**, 177–189 (2010).
101. Owens, R. a., Hammel, S., Sheridan, K. J., Jones, G. W. & Doyle, S. A Proteomic

- Approach to Investigating Gene Cluster Expression and Secondary Metabolite Functionality in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS One* **9**, e106942 (2014).
- 102. Singh, S. *et al.* Proteomic Characterization of *Aspergillus fumigatus* Treated with an Antifungal Coumarin for Identification of Novel Target Molecules of Key Pathways. (2012).
 - 103. Sugui, J. A. *et al.* Genes differentially expressed in conidia and hyphae of *Aspergillus fumigatus* upon exposure to human neutrophils. *PLoS One* **3**, (2008).
 - 104. Suh, M. J. *et al.* Development stage-specific proteomic profiling uncovers small, lineage specific proteins most abundant in the *Aspergillus fumigatus* conidial proteome. *Proteome Sci.* **10**, 1–13 (2012).
 - 105. Teutschbein, J. *et al.* Proteome profiling and functional classification of intracellular proteins from conidia of the human-pathogenic mold *aspergillus fumigatus*. *J. Proteome Res.* **9**, 3427–3442 (2010).
 - 106. Teutschbein, J. *et al.* Proteomic profiling of serological responses to *aspergillus fumigatus* antigens in patients with invasive aspergillosis. *J. Proteome Res.* **15**, 1580–1591 (2016).
 - 107. Vödisch, M. *et al.* Analysis of the *Aspergillus fumigatus* proteome reveals metabolic changes and the activation of the pseurotin A biosynthesis gene cluster in response to hypoxia. *J. Proteome Res.* **10**, 2508–2524 (2011).
 - 108. Perkins, A., Nelson, K. J., Parsonage, D., Poole, L. B. & Karplus, P. A. Peroxiredoxins: guardians against oxidative stress and modulators of peroxide signaling. *Trends Biochem. Sci.* **40**, 435–45 (2015).
 - 109. Li, T. T. & Chou, K. C. The quantitative relations between diffusion-controlled reaction rate and characteristic parameters in enzyme-substrate reaction systems. I. Neutral substrates. *Sci. Sin.* **19**, 117–36
 - 110. Reyes, A. M. *et al.* Oxidizing substrate specificity of *Mycobacterium tuberculosis* alkyl hydroperoxide reductase E: Kinetics and mechanisms of oxidation and overoxidation. *Free Radic. Biol. Med.* **51**, 464–473 (2011).
 - 111. Tairum, C. A. *et al.* Catalytic Thr or Ser Residue Modulates Structural Switches in 2-Cys Peroxiredoxin by Distinct Mechanisms. *Sci. Rep.* **6**, 33133 (2016).
 - 112. Ogunscu, R., Rettori, D., Munhoz, D. C., Netto, L. E. S. & Augusto, O. Reactions of yeast thioredoxin peroxidases I and II with hydrogen peroxide and peroxy nitrite: rate constants by competitive kinetics. *Free Radic. Biol. Med.* **42**, 326–34 (2007).
 - 113. Trujillo, M. *et al.* Pre-steady state kinetic characterization of human peroxiredoxin 5: Taking advantage of Trp84 fluorescence increase upon oxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* **467**, 95–106 (2007).
 - 114. Nagy, P. *et al.* Model for the exceptional reactivity of peroxiredoxins 2 and 3 with

- hydrogen peroxide: a kinetic and computational study. *J. Biol. Chem.* **286**, 18048–55 (2011).
115. Rocha, M. C. *et al.* Analyses of the three 1-Cys Peroxiredoxins from *Aspergillus fumigatus* reveal that cytosolic Prx1 is central to H₂O₂ metabolism and virulence. *Sci. Rep.* **8**, 1–18 (2018).
 116. Feld, K. *et al.* Tyrosine substitution of a conserved active-site histidine residue activates *Plasmodium falciparum* peroxiredoxin 6. *Protein Sci.* 1–11 (2018). doi:10.1002/pro.3490
 117. De Armas, M. I. *et al.* Rapid peroxy nitrite reduction by human peroxiredoxin 3: Implications for the fate of oxidants in mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.* **130**, 369–378 (2019).
 118. Peskin, A. V. *et al.* Hyperoxidation of peroxiredoxins 2 and 3: Rate constants for the reactions of the sulfenic acid of the peroxidatic cysteine. *J. Biol. Chem.* **288**, 14170–14177 (2013).
 119. Wood, Z. a, Poole, L. B. & Karplus, P. A. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science* **300**, 650–3 (2003).
 120. Karplus, P. A. & Poole, L. B. Peroxiredoxins as Molecular Triage Agents, Sacrificing Themselves to Enhance Cell Survival During a Peroxide Attack. *Mol. Cell* **45**, 275–278 (2012).
 121. Hugo, M. *et al.* Thiol and sulfenic acid oxidation of AhpE, the one-cysteine peroxiredoxin from *Mycobacterium tuberculosis*: Kinetics, acidity constants, and conformational dynamics. *Biochemistry* **48**, 9416–9426 (2009).
 122. Hillmann, F. *et al.* The Crystal Structure of Peroxiredoxin Asp f3 Provides Mechanistic Insight into Oxidative Stress Resistance and Virulence of *Aspergillus fumigatus*. *Sci. Rep.* **6**, 33396 (2016).
 123. Mishra, S. & Imlay, J. Why do bacteria use so many enzymes to scavenge hydrogen peroxide? *Arch. Biochem. Biophys.* **525**, 145–160 (2012).
 124. Slesiona, S. *et al.* Persistence versus escape: *Aspergillus terreus* and *Aspergillus fumigatus* employ different strategies during interactions with macrophages. *PLoS One* **7**, (2012).
 125. Gersuk, G. M., Underhill, D. M., Zhu, L. & Marr, K. A. Dectin-1 and TLRs Permit Macrophages to Distinguish between Different *Aspergillus fumigatus* Cellular States. *J. Immunol.* **176**, 3717–3724 (2006).
 126. Chapman, S. K. & Reid, G. A. *Flavoprotein protocols*. **131**, (Humana Press, 1999).
 127. Oliveira, M. a *et al.* Insights into the specificity of thioredoxin reductase-thioredoxin interactions. A structural and functional investigation of the yeast thioredoxin system. *Biochemistry* **49**, 3317–26 (2010).

128. Netto, S., Chem, J. B., Munhoz, D. C. & Eduardo, L. Metabolism and Bioenergetics : Cytosolic Thioredoxin Peroxidase I and II Are Important Defenses of Yeast against Organic Hydroperoxide Insult: CATALASES AND PEROXIREDOXINS COOPERATE IN THE DECOMPOSITION OF H₂O₂ BY YEAST Daniela Cristina Munhoz and Luis E. (2004). doi:10.1074/jbc.
129. Munhoz, D. C. & Netto, L. E. S. Cytosolic Thioredoxin Peroxidase I and II Are Important Defenses of Yeast against Organic Hydroperoxide Insult. *J. Biol. Chem.* **279**, 35219–35227 (2004).
130. Pedrajas, J. R. *et al.* Glutathione Is the Resolving Thiol for Thioredoxin Peroxidase Activity of 1-Cys Peroxiredoxin Without Being Consumed During the Catalytic Cycle. *Antioxid. Redox Signal.* **24**, 115–128 (2016).
131. Luthman, M. & Holmgren, A. Glutaredoxin from calf thymus. *J. Biol. Chem.* **257**, 6686–6690 (1982).
132. Hernández, Y., Lobo, M. G. & González, M. Determination of vitamin C in tropical fruits: A comparative evaluation of methods. *Food Chem.* **96**, 654–664 (2006).
133. Washko, P. W., Hartzell, W. O. & Levine, M. Ascorbic acid analysis using high-performance liquid chromatography with coulometric electrochemical detection. *Anal. Biochem.* **181**, 276–282 (1989).
134. Huh, W. K. *et al.* d-Erythroascorbic acid activates cyanide-resistant respiration in *Candida albicans*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **369**, 401–406 (2008).
135. Gallogly, M. M., Starke, D. W. & Mieyal, J. J. Mechanistic and Kinetic Details of Catalysis of Thiol-Disulfide Exchange by Glutaredoxins and Potential Mechanisms of Regulation. *Antioxid. Redox Signal.* **11**, 1059–1081 (2009).
136. Anschau, V. Caracterização cinética da redução das 1-Cys Peroxirredoxinas por ascorbato. (Universidade de São Paulo, 2016).
137. Baroja-Mazo, A. *et al.* Characterisation and biosynthesis of D-erythroascorbic acid in *Phycomyces blakesleeanus*. *Fungal Genet. Biol.* **42**, 390–402 (2005).
138. Amako, K. *et al.* NAD⁺-specific D-arabinose dehydrogenase and its contribution to erythroascorbic acid production in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **580**, 6428–34 (2006).
139. Keates, S. E., Loewu, F. A., Helms, G. L. & Zink, D. L. 5-O-(a-D-galactopyranosyl)-D-glycero-pent-2-enono-1,4-lactone: Characterization in the Oxalate-Producing Fungus, *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytochemistry* **49**, 2397–2401 (1998).
140. Okamura, M. Distribution of ascorbic acid analogs and associated glycosides in mushrooms. *J Nutr Sci Vitaminol* **40**, 81–94 (1994).
141. Sauer, M., Branduardi, P., Valli, M. & Porro, D. Production of L -Ascorbic Acid by Metabolically Engineered *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii*.

- 70**, 6086–6091 (2004).
142. Huh, W. K. *et al.* D-erythroascorbic acid is an important antioxidant molecule in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **30**, 895–903 (1998).
 143. Spickett, C. M., Smirnoff, N. & Pitt, A. R. The biosynthesis of erythroascorbate in *Saccharomyces cerevisiae* and its role as an antioxidant. *Free Radic. Biol. Med.* **28**, 183–92 (2000).
 144. Cheah, I. K. & Halliwell, B. Ergothioneine; antioxidant potential, physiological function and role in disease. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1822**, 784–793 (2012).
 145. Cumming, B. M., Chinta, K. C., Reddy, V. P. & Steyn, A. J. C. Role of Ergothioneine in Microbial Physiology and Pathogenesis. *Antioxid. Redox Signal.* **28**, ars.2017.7300 (2017).
 146. Halliwell, B., Cheah, I. K. & Drum, C. L. Ergothioneine, an adaptive antioxidant for the protection of injured tissues? A hypothesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **470**, 245–250 (2016).
 147. Bello, M. H., Barrera-Perez, V., Morin, D. & Epstein, L. The *Neurospora crassa* mutant NcΔEgt-1 identifies an ergothioneine biosynthetic gene and demonstrates that ergothioneine enhances conidial survival and protects against peroxide toxicity during conidial germination. *Fungal Genet. Biol.* **49**, 160–172 (2012).
 148. Olson, K. R. & Straub, K. D. The Role of Hydrogen Sulfide in Evolution and the Evolution of Hydrogen Sulfide in Metabolism and Signaling. *Physiology* **31**, 60–72 (2016).
 149. Gadalla, M. M. & Snyder, S. H. Hydrogen sulfide as a gasotransmitter. *J. Neurochem.* **113**, 14–26 (2010).
 150. Kimura, H. Hydrogen Sulfide: From Brain to Gut. *Antioxid. Redox Signal.* **12**, 1111–1123 (2010).
 151. Cuevasanta, E., Möller, M. N. & Alvarez, B. Biological chemistry of hydrogen sulfide and persulfides. *Arch. Biochem. Biophys.* **617**, 9–25 (2017).
 152. Hugo, M. *et al.* Mycothiol/mycoredoxin 1-dependent reduction of the peroxiredoxin AhpE from mycobacterium tuberculosis. *J. Biol. Chem.* **289**, 5228–5239 (2014).
 153. Perkins, A. *et al.* Peroxiredoxin Catalysis at Atomic Resolution. *Structure* **24**, 1668–1678 (2016).
 154. Benipal, B., Feinstein, S. I., Chatterjee, S., Dodia, C. & Fisher, A. B. Inhibition of the phospholipase A2 activity of peroxiredoxin 6 prevents lung damage with exposure to hyperoxia. *Redox Biol.* **4**, 321–327 (2015).
 155. Manevich, Y. & Fisher, A. B. Peroxiredoxin 6, a 1-Cys peroxiredoxin, functions in antioxidant defense and lung phospholipid metabolism*. *Free Radic. Biol. Med.* **38**,

- 1422–1432 (2005).
156. Manevich, Y., Reddy, K. S., Shubaeva, T., Feinstein, S. I. & Fisher, A. B. Structure and phospholipase function of peroxiredoxin 6: identification of the catalytic triad and its role in phospholipid substrate binding. *J. Lipid Res.* **48**, 2306–2318 (2007).
 157. Wu, Y. *et al.* Mitogen-activated protein kinase-mediated phosphorylation of peroxiredoxin 6 regulates its phospholipase A 2 activity. *Biochem. J.* **419**, 669–679 (2009).
 158. Rahaman, H. *et al.* Increased Phospholipase A 2 Activity with Phosphorylation of Peroxiredoxin 6 Requires a Conformational Change in the Protein. *Biochemistry* **51**, 5521–5530 (2012).
 159. Chatterjee, S. *et al.* Peroxiredoxin 6 phosphorylation and subsequent phospholipase A2 activity are required for agonist-mediated activation of NADPH oxidase in mouse pulmonary microvascular endothelium and alveolar macrophages. *J. Biol. Chem.* **286**, 11696–11706 (2011).
 160. Nevalainen, T. J. 1-Cysteine peroxiredoxin: A dual-function enzyme with peroxidase and acidic Ca²⁺-independent phospholipase A2 activities. *Biochimie* **92**, 638–644 (2010).
 161. Kim, T. S. *et al.* Identification of a human cDNA clone for lysosomal type Ca²⁺-independent phospholipase A2 and properties of the expressed protein. *J. Biol. Chem.* **272**, 2542–2550 (1997).
 162. Chen, J.-W. 1-Cys Peroxiredoxin, a Bifunctional Enzyme with Glutathione Peroxidase and Phospholipase A2 Activities. *J. Biol. Chem.* **275**, 28421–28427 (2000).
 163. Schu, S., Green, F. H. Y., Bachofen, H. & Tn, A. Formation and structure of surface films: captive bubble surfactometry. *Adsorpt. J. Int. Adsorpt. Soc.* **1408**, 180–202 (1998).
 164. Olmeda, B., Villén, L., Cruz, A., Orellana, G. & Perez-Gil, J. Pulmonary surfactant layers accelerate O₂ diffusion through the air-water interface. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1798**, 1281–1284 (2010).
 165. Veldhuizen, E. J. & Haagsman, H. P. Role of pulmonary surfactant components in surface film formation and dynamics. *Bba* **1467**, (2000).
 166. Fisher, a B. & Dodia, C. Lysosomal-type PLA2 and turnover of alveolar DPPC. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **280**, L748–54 (2001).
 167. Ambruso, D. R., Ellison, M. A., Thurman, G. W. & Leto, T. L. Peroxiredoxin 6 translocates to the plasma membrane during neutrophil activation and is required for optimal NADPH oxidase activity. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1823**, 306–315 (2012).

Anexos

Anexo I - Artigo publicado. Descreve pela primeira vez as Prx 1-Cys de *A. fumigatus*. Minhas principais contribuições foram com os experimentos envolvendo as proteínas recombinantes e na redação e revisão do artigo.

Rocha MC, de Godoy KF, Bannitz-Fernandes R, Fabri JHTM, Barbosa MMF, de Castro PA, Almeida F, Goldman GH, da Cunha AF, Netto LES, de Oliveira MA, Malavazi I. **Analyses of the three 1-Cys Peroxiredoxins from Aspergillus fumigatus reveal that cytosolic Prx1 is central to H₂O₂ metabolism and virulence.** Sci Rep. 2018 Aug 17;8(1):12314. doi: 10.1038/s41598-018-30108-2. PubMed PMID: 30120327; PubMed Central PMCID: PMC6098058.

Anexo II - Artigo publicado. Avalia o papel de Prx1 na proteção contra H₂O₂ exógeno através de microeletrodo. Minha contribuição envolveu todo o processo do artigo: idéia, desenho experimental, experimentação, análise de dados, redação e revisão do artigo.

Santos CS, Bannitz-Fernandes R, Lima AS, Tairum CA, Malavazi I, Netto LES, Bertotti M. **Monitoring H₂O₂ inside Aspergillus fumigatus with an Integrated Microelectrode: The Role of Peroxiredoxin Protein Prx1.** Anal Chem. 2018 Feb 20;90(4):2587-2593. doi: 10.1021/acs.analchem.7b04074. Epub 2018 Jan 30. PubMed PMID: 29345916.

Anexo III - Artigo publicado. Analisa as principais características de Ohr (peroxidase) de eucariotos. Minha contribuição envolveu o auxílio nas técnicas de cultivo de fungo. Passei aproximadamente 60 dias no laboratório do Prof. Dr. Iran Malavazi aprendendo técnicas de cultivo e manipulação genética de fungo.

Meireles DA, Domingos RM, Gaiarsa JW, Ragnoni EG, Bannitz-Fernandes R, da Silva Neto JF, de Souza RF, Netto LES. **Functional and evolutionary characterization of Ohr proteins in eukaryotes reveals many active homologs among pathogenic fungi.** Redox Biol. 2017 Aug;12:600-609. doi: 10.1016/j.redox.2017.03.026. Epub 2017 Apr 2. PubMed PMID: 28391181; PubMed Central PMCID: PMC5384416.

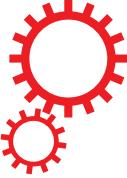
Anexo IV - Manuscrito em fase de submissão. Apenas as primeiras duas páginas estão disponíveis nesta tese. Avalia o envolvimento da atividade de PLA2 da Prx6 de camundongo na inflamação aguda pulmonar induzida por sepse. Minhas maiores contribuições foram em relação aos experimentos com células e medida de citocinas.

Vázquez-Medina JP, Tao JQ, Patel P, Bannitz-Fernandes R, Dodia C, Sorokina EM, Feinstein SI, Chatterjee S, Fisher AB. **Genetic inactivation of the phospholipase A2 activity of peroxiredoxin 6 in mice protects against LPS-induced acute lung injury.** Não publicado.

Anexo V - Manuscrito em fase final de elaboração. Apenas as primeiras duas páginas estão disponíveis nesta tese. Avalia as diferenças estruturais entre TSA1 e TSA2 (Prxs de *S. cerevisiae*) que estão envolvidas na susceptibilidade a superoxidação. Minha principal contribuição envolve as cinéticas enzimáticas das reações de superoxidação.

Breyer CA, Cassago A, Bannitz-Fernandes R, Tairum Jr C, Netto LES, Portugal R, Oliveira MA. **Slight divergences between Tsa1 and Tsa2 of Saccharomyces cerevisiae determine differences on hydroperoxide preference, susceptibility to overoxidation and formation of HMW complexes.** Não publicado.

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

Analyses of the three 1-Cys Peroxiredoxins from *Aspergillus fumigatus* reveal that cytosolic Prx1 is central to H₂O₂ metabolism and virulence

Received: 26 March 2018

Accepted: 24 July 2018

Published online: 17 August 2018

Marina Campos Rocha¹, Krissia Franco de Godoy¹, Renata Bannitz-Fernandes^{ID 2}, João H. T. Marilhano Fabri¹, Mayra M. Ferrari Barbosa^{ID 1,6}, Patrícia Alves de Castro³, Fausto Almeida⁴, Gustavo Henrique Goldman^{ID 3}, Anderson Ferreira da Cunha¹, Luis E. S. Netto^{ID 2}, Marcos Antonio de Oliveira⁵ & Iran Malavazi^{ID 1}

Standing among the front defense strategies against pathogens, host phagocytic cells release various oxidants. Therefore, pathogens have to cope with stressful conditions at the site of infection. Peroxiredoxins (Prx) are highly reactive and abundant peroxidases that can support virulence and persistence of pathogens in distinct hosts. Here, we revealed that the opportunistic human pathogen *A. fumigatus* presents three 1-Cys Prx (Prx6 subfamily), which is unprecedented. We showed that PrxB and PrxC were in mitochondria, while Prx1 was in cytosol. As observed for other Prxs, recombinant Prx1 and PrxC decomposed H₂O₂ at elevated velocities (rate constants in the 10⁷ M⁻¹s⁻¹ range). Deletion mutants for each Prx displayed higher sensitivity to oxidative challenge in comparison with the wild-type strain. Additionally, cytosolic Prx1 was important for *A. fumigatus* survival upon electron transport dysfunction. Expression of Prxs was dependent on the SakA^{HOG1} MAP kinase and the Yap1^{YAP1} transcription factor, a global regulator of the oxidative stress response in fungi. Finally, cytosolic Prx1 played a major role in pathogenicity, since it is required for full virulence, using a neutropenic mouse infection model. Our data indicate that the three 1-Cys Prxs act together to maintain the redox balance of *A. fumigatus*.

Aspergillus fumigatus is a mold with a notorious ability to infect immunocompromised individuals and therefore cause severe systemic infections in this cohort of patients. *A. fumigatus* solely accounts for approximately 90% incidence of the invasive pulmonary aspergillosis (IPA) cases worldwide. Mortality rates associated with IPA can be as high as 50% even if properly diagnosed and treated. However, if the diagnosis is not reached or is delayed, death can occur in nearly 100% of infected individuals^{1,2}.

Among the front defense strategies against pathogens, host effector immune cells release oxidants, such as reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS). This process ultimately generates oxidative/nitrosative stresses to the pathogen at the infection site³. At high levels, ROS and RNS cause damage to the macromolecules of invading microorganisms⁴. Furthermore, pathogens must also metabolize ROS produced by its

¹Departamento de Genética e Evolução, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 13.565-905, Brazil. ²Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 05508-090, Brazil. ³Departamento de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 14.040-903, Brazil.

⁴Departamento de Bioquímica e Imunologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 14.040-900, Brazil. ⁵Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Campus do Litoral Paulista, São Vicente, SP, 11.380-972, Brazil. ⁶Present address: Instituto Butantan, São Paulo, SP, 05503-900, Brazil. Marina Campos Rocha and Krissia Franco de Godoy contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to I.M. (email: imalavazi@ufscar.br)

own metabolism. To detoxify the ROS, which include several hydroperoxide species such as H₂O₂ and organic hydroperoxides, numerous complex mechanisms have evolved in pathogens^{5–8}. Therefore, hydroperoxide scavenging enzymes are highly relevant for the success of pathogen adaptation and colonization of the host tissues. Moreover, low-level production of hydroperoxides is also implied in fungal cell growth and differentiation^{3,9}. In this sense, antioxidant proteins in pathogens may regulate hydroperoxides in suitable levels to allow cell growth and differentiation¹⁰.

Among such defense mechanisms, peroxiredoxins (Prxs) are Cys-based peroxidases that play pivotal roles to support the virulence and persistence of several microorganisms in distinct hosts^{11–16}. Prxs are abundant, highly reactive and specific towards oxidants, such as H₂O₂, lipid hydroperoxides and peroxy nitrite ($k = 10^6$ – 10^8 M⁻¹·s⁻¹)^{17–19}. Moreover, Prxs can be found in the cytosol, mitochondria, nuclei and peroxisomes and are associated in the membranes or even secreted to the extracellular space^{20,21}. Although all Prxs have a fully conserved Cys residue, the so-called peroxidatic cysteine (C_p), directly involved in the reduction of hydroperoxides, the Prx family presents high functional and structural diversity. While some Prxs have only the C_p, others have a second residue capable of forming a disulfide bond with C_p, called the resolution cysteine (C_R). Based on this catalytic mechanism, Prx enzymes are commonly classified as 1-Cys, when only one cysteine is involved in the catalytic cycle, or 2-Cys, when the C_R is present^{22,23}.

Comparatively, 1-Cys Prxs are less studied than the 2-Cys counterparts. Notably, 1-Cys Prx from mammals (Prdx6) is a dual-function enzyme with both peroxidase and acidic Ca²⁺-independent phospholipase A2 activities²⁴. This additional function is thought to protect cell membrane phospholipids against peroxidation and hydrolysis²⁵. Remarkably, some 1-Cys Prxs from pathogens have distinguishing features in comparison with the corresponding host enzymes, placing them as promising targets for the development of specific drugs^{11,19,26–28}. For instance, a 1-Cys Prx from the plant fungal pathogen *Magnaporthe oryzae* and from the mammalian bacterial pathogen *Pseudomonas aeruginosa* are necessary to decompose ROS generated by the host and therefore important for their virulence^{12,13}.

In this study, we describe for the first time an organism that presents three 1-Cys Prx enzymes, all of them belonging to the Prx6 sub-family²⁹. In contrast, most organisms present only one gene for 1-Cys Prx in their genomes. To gain insights in this unique repertoire of antioxidant enzymes, we performed several genetic and biochemical analysis of Prx1, PrxB and PrxC enzymes. Among other aspects, we observed that two of the 1-Cys Prx are mitochondrial enzymes (PrxB and PrxC), whereas the other is cytosolic (Prx1). Furthermore, the expression of the three 1-Cys Prxs is regulated by the signaling pathways involving the SakA^{HOG1} MAP kinase and Yap1^{YAP1} transcription factor. Finally, cytosolic Prx1 is the main 1-Cys Prx involved in the tolerance of *A. fumigatus* to oxidative damage, playing a major role in pathogenicity.

Results

The *A. fumigatus* genome has three 1-Cys Prx genes. Initially, the repertoire of antioxidant enzymes in the *A. fumigatus* A1163 genome was analyzed using Prx enzymes from *Saccharomyces cerevisiae* and *Homo sapiens* as query sequences. This analysis revealed that *A. fumigatus* possesses six putative Prx-encoding genes. Three of them encoding atypical 2-Cys Prxs (having an intramolecular disulfide as a catalytic intermediate): AFUB_049980, AFUB_063010 and the AFUB_096050¹⁴. In contrast, no typical 2-Cys Prx (Prx1/AhpC subgroup²⁹) was found. We also identified three genes encoding 1-Cys isoforms: AFUB_065670, AFUB_062560 and AFUB_080670. Notably, this is the first description of a genome containing three genes encoding 1-Cys Prxs that belong to the Prx6 subgroup²⁹. We named AFUB_062560 and AFUB_080670 as *prxB* and *prxC*, respectively to be consistent with *A. fumigatus* nomenclature. The gene AFUB_065670 was previously named as *prx1*³⁰.

We focused our studies on the three 1-Cys Prx enzymes, since they are less studied than the 2-Cys Prx counterparts. Moreover, the number of these isoforms found in the *A. fumigatus* genome is unprecedented, frequently only one 1-Cys Prx isoform or none is found in the majority of organisms. Our results revealed that except for *A. fumigatus*, all *Aspergillus* species available in the *Aspergillus* Genome Database (<http://www.aspergillusgenome.org>) possess at least two isoforms of 1-Cys Prx with amino acid identity ranging from 70–90% with the *A. fumigatus* 1-Cys Prx counterparts. In each species, one of the two isoforms presented a putative N-terminal mitochondrial target sequence (probability > 90%). Noteworthy, only in *A. fumigatus* strains (A1163 and Af293), three 1-Cys Prx isoforms were detected. These data reinforces that the number of isoforms of 1-Cys Prx is unusual in *Aspergilli*, especially in *A. fumigatus*.

The three *A. fumigatus* 1-Cys Prx genes presented moderate similarity with the human orthologue (Prx6), ranging from 37% (*prx1*) to 51% identity (*prxB* and *prxC*). In addition, they contain a C_p embedded in the highly conserved PVC_PTTE motif, which is archetypal to the Prx6 subclass (Fig. 1)^{25,29,31}.

All the Prx enzymes characterized to date present a catalytic triad that also comprises a Thr (in some cases replaced by a Ser) and an Arg residue¹⁸. As expected, these three residues are conserved in Prx1 and PrxC, but surprisingly, the catalytic triad Thr is substituted by a His residue in the primary sequence of PrxB. Unfortunately, we were unable to obtain the soluble form of recombinant PrxB to investigate the ability of this enzyme to reduce hydrogen peroxide (see below). PrxC presents a N-terminal extension (Fig. 1), suggesting mitochondrial localization, as is seen for the 1-Cys Prx from *S. cerevisiae* (Prx1)³². Indeed, PrxC displayed a high probability (0.99) of being targeted to mitochondria with the predicted cleavage site located at the residue 59.

***A. fumigatus* Prx1 and PrxC are able to efficiently decompose H₂O₂.** Next, we attempted to express the three 1-Cys Prx enzymes in *Escherichia coli* strains, but after several trials no soluble PrxB was obtained, precluding further characterization. In contrast, Prx1 and PrxC were successfully expressed and purified (Supplementary Fig. S1). Then, their ability to decompose H₂O₂ was analyzed by a competitive assay against horseradish peroxidase (HRP). The rate constants for the reactions of Prx1 and PrxC with H₂O₂ were both in the 10⁷ M⁻¹s⁻¹ range (Fig. 2), therefore indicating that these two enzymes are highly efficient peroxidases.

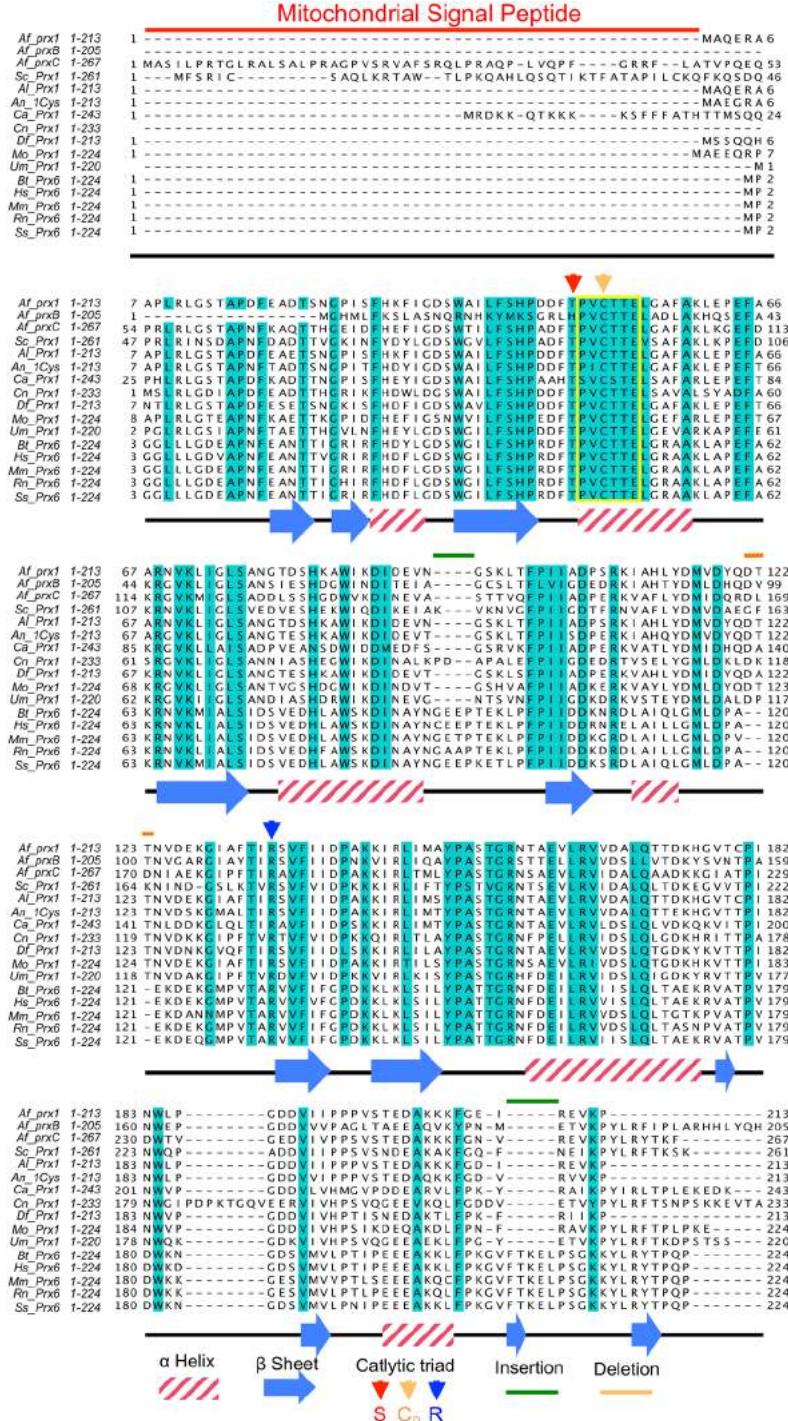


Figure 1. Sequence alignment of 1-Cys Prx from *A. fumigatus*, other fungi and mammals. Identical residues among sequences are depicted in blue. The yellow box denotes the conserved motif PVC_PTTE in the Prx6 subclass. The colored arrowheads indicate the conserved amino acids of the catalytic triad: Thr (red), C_p (orange) and Arg (blue). The colored bars denote the mitochondria signal peptide (red), residues insertions (green) or deletions (orange). The secondary structure assignments based on the structure of *H. sapiens* Prx6 (PDB code: 1PRX) are shown below the amino acid sequences. The species abbreviation initials are given in italics and are as follows: *Af*_Prx1 = *A. fumigatus* prx1 (AFUB_065670); *Af*_PrxB = *A. fumigatus* prxB (AFUB_062560); *Af*_PrxC = *A. fumigatus* prxC (AFUB_080670); *Sc*_Prx1 = *S. cerevisiae* Prx1 (NP_009489.1); *Al*_Prx1 = *A. lentinus* Prx1 (GAQ08014.1); *An*_Prx1 = *A. nidulans* 1-Cys peroxiredoxin (CBF85378.1); *Ca*_Prx1 = *Candida albicans* putative Prx1 (XP_716935.1); *Cn*_Prx1 = *Cryptococcus neoformans* Prx (XP_567781); *Df*_Prx1 = *Debaromyces fabryi* Prx (XP_015465609.1); *Mo*_Prx1 = *Magnaporthe oryzae* mitochondrial peroxiredoxin Prx1 (XP_003715830.1); *Um*_Prx1 = *Ustilago maydis* Prx (XP_011392689); *Hs*_Prx6 = *Homo sapiens* Prx6 (NP_004896.1); *Bt*_Prx6 = *Bos taurus* Prx6 (NP_777068.1); *Mm*_Prx6 = *Mus musculus* Prx6 (NP_031479.1); *Rn*_Prx6 = *Rattus norvegicus* Prx6 (NP_446028.1); *Ss*_Prx6 = *Sus scrofa* Prx6 (NP_999573.1).

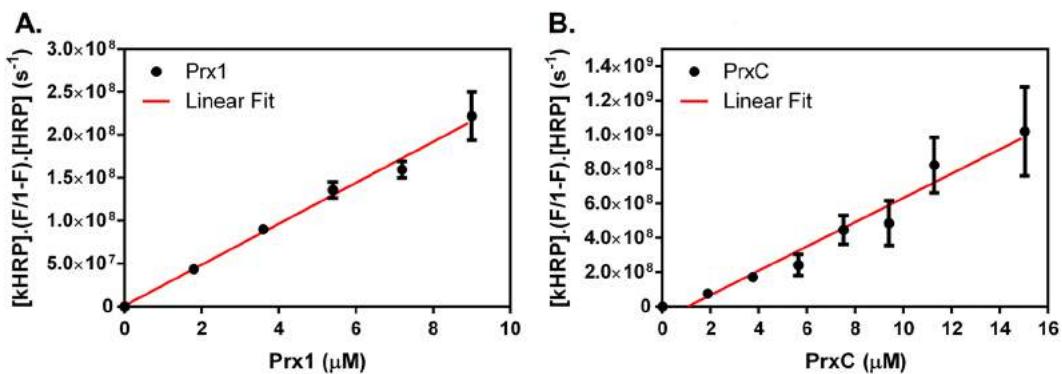


Figure 2. Oxidation rates of *A. fumigatus* Prx1 and PrxC. The second-order rate constants for the reactions of Prx1 (A) and PrxC (B) were determined using growing concentrations of Prx (2 – $16\text{ }\mu\text{M}$) with H_2O_2 ($4\text{ }\mu\text{M}$) by the competition with HRP (horseradish peroxidase) ($8\text{ }\mu\text{M}$). The rates were determined as $k_{\text{Prx1}} = 2.28 \times 10^7\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ and $k_{\text{PrxC}} = 7.07 \times 10^7\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. The left y-axis is relative to the enzyme activity and the x-axis is relative to the enzyme concentration added to the reaction. The results shown are mean \pm SD obtained from three independent replicates.

Their abilities to reduce H_2O_2 were similar to other Prxs previously described^{21,33,34} and comparable to catalases and glutathione peroxidases^{35,36}. Original absorbance spectra for the HRP competitive assay are available in Supplementary Figure S2.

Unfortunately, we were unable to identify reductants for Prx1 and PrxC, which preclude us from performing bi-substrate, steady-state kinetics. Preliminary studies indicated that thioredoxin and GSH are poor reducing substrates for these peroxidases.

1-Cys Prxs differentially contribute to oxidative challenge tolerance. Subsequently, *prx1*, *prxB* and *prxC* were deleted (Supplementary Fig. S3A-K) and phenotypes were investigated. Each individual gene deletion strain was also complemented with the corresponding wild-type allele to discard the occurrence of possible secondary mutations. The mRNA levels for each Prx were assessed by RT-qPCR. As expected, they were similar in the complemented and wild-type strains, while absent in the corresponding null mutant (data not shown).

We also attempted to isolate double and triple mutants for *prx1*, *prxB* and *prxC* genes, but we only succeeded in obtaining the $\Delta prxB\Delta prxC$ double mutant (Supplementary Fig. S3M). Remarkably, any double mutant containing the deletion of the *prx1* gene seemed to be non-viable when we plated the transformed protoplasts in the regeneration medium (YG supplemented with 0.6 M KCl as osmotic stabilizer). Therefore, we isolated a conditional mutant for *prx1* under the control of the nitrate reductase promoter (*niiA*)³⁷ to be used in the construction of double mutants. However, under repressive conditions (Minimal Medium supplemented with $50\text{ mM ammonium tartrate}$), the *niiA::prx1* mutant did not exhibit phenotypes similar to the null mutant $\Delta prx1$ in the presence of oxidants (data not shown). Possibly, transcriptional repression achieved by the *niiA* promoter was not strong enough to generate a loss-of-function phenotype. Further experimentation is required to understand the essentiality of the *prx1* gene in backgrounds already deficient for the other 1-Cys Prxs.

Next, phenotypes were evaluated in cells grown in minimal medium (MM). In non-stressing conditions, the deletion mutants displayed radial growth comparable to the wild-type and complemented strains (Fig. 3). The growth kinetics, germination rates and conidiation levels were also analyzed but no significant differences were observed for the three 1-Cys Prx null mutants in comparison to the wild-type strain (data not shown). However, the three Prx null mutants displayed increased sensitivity to paraquat and menadione (Fig. 4 and Supplementary Fig. S4), two compounds that continuously generated superoxide and H_2O_2 by the redox cycling. Surprisingly, the tolerance of the double mutant $\Delta prxB\Delta prxC$ to paraquat was comparable to the wild-type strain, suggesting compensatory effects such as increased expression of other antioxidant enzyme. As a general trend, the sensitivities to oxidative challenge were more evident for the $\Delta prx1$ mutant.

In contrast, the three Prx mutants were as resistant as wild-type cells to exogenous H_2O_2 treatment (Supplementary Fig. S5). Possibly, the three 1-Cys Prx enzymes might be more adapted to the removal of H_2O_2 continuously formed by the autoxidation of redox compounds, such as paraquat, menadione (Fig. 4) and components of the respiratory chain.

Since glucose represses the expression of genes involved in mitochondrial biogenesis, respiratory metabolism and antioxidant defense in *S. cerevisiae*³⁸, we hypothesized that sensitivity to H_2O_2 would be altered in cells growing in non-fermentative carbon sources, such as glycerol and lactate. However, again, no increased sensitivity was observed, even in the double mutant $\Delta prxB\Delta prxC$ (Supplementary Fig. S5A-B).

Additionally, *prx1*, *prxB* and *prxC* were dispensable for voriconazole and caspofungin susceptibility (data not shown) while a slight sensitivity to amphotericin B and SDS was observed for the $\Delta prx1$ mutant (Supplementary Fig. S6).

In summary, our phenotypic analysis indicated that all three 1-Cys Prx are relevant in conditions where H_2O_2 is continuously formed by the redox cycling of paraquat and menadione and $\Delta prx1$ is more sensitive to these stressful conditions than the other two deletion mutants.

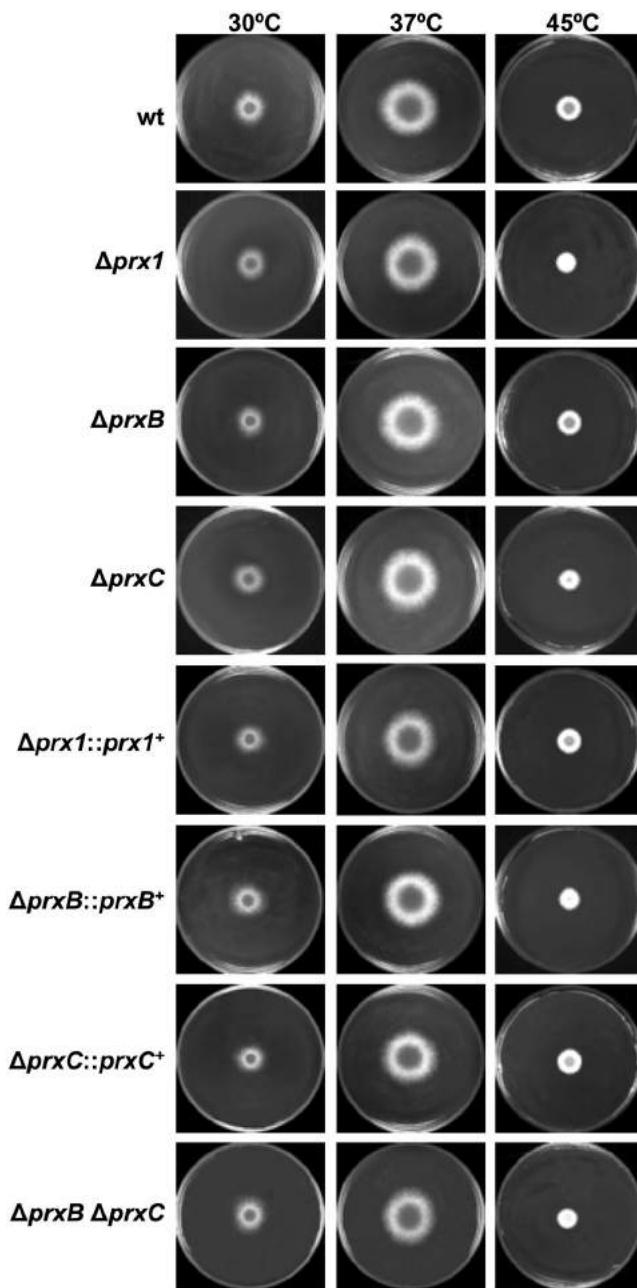


Figure 3. Radial growth of the wild-type and Prx null mutants on MM. 1×10^4 conidia of each strain were inoculated onto the center of solid MM and incubated at the indicated temperatures for 72 h. Results are representative of triplicate experiments with similar results.

Sub-cellular localization of *A. fumigatus* 1-Cys Prxs. To assess the subcellular localization of *A. fumigatus* Prxs, we constructed the strains expressing Prx1, PrxB and PrxC fused to GFP and under the control of their native promoters (Supplementary Fig. S3N-S). The sensitivities of these strains to oxidative insult were comparable to the wild-type strain indicating that they are fully functional (Supplementary Fig. S7). The Prx1::GFP strain produced a strong and diffuse fluorescent signal without a noticeably sub-cellular accumulation, consistent with a cytosolic localization (Fig. 5). In contrast, the fluorescence of PrxB-GFP co-localized with the mitochondrial network, but the signal intensity was weaker than that of Prx1-GFP and PrxC-GFP. The PrxC-GFP fusion protein produced the most intense fluorescent signal, which also co-localized with Mitotracker, being evenly distributed along mitochondria (Fig. 5A). This was expected, since as mentioned above, the product of the *prxC* gene presents a predicted presequence signal for mitochondrial localization (Fig. 1). As an alternative method, we performed cell fractionation of the mycelium and samples were then analyzed by Western blot using anti-GFP to detect each of the 1-Cys Prx. According to the microscopic studies, Prx1 was detected in the cytosolic fractions, while PrxB and PrxC were present in the mitochondrial fractions (Fig. 5B). Therefore, the three 1-Cys Prxs are abundant in the cytosol and mitochondrial compartments even in the absence of exogenous oxidative challenge.

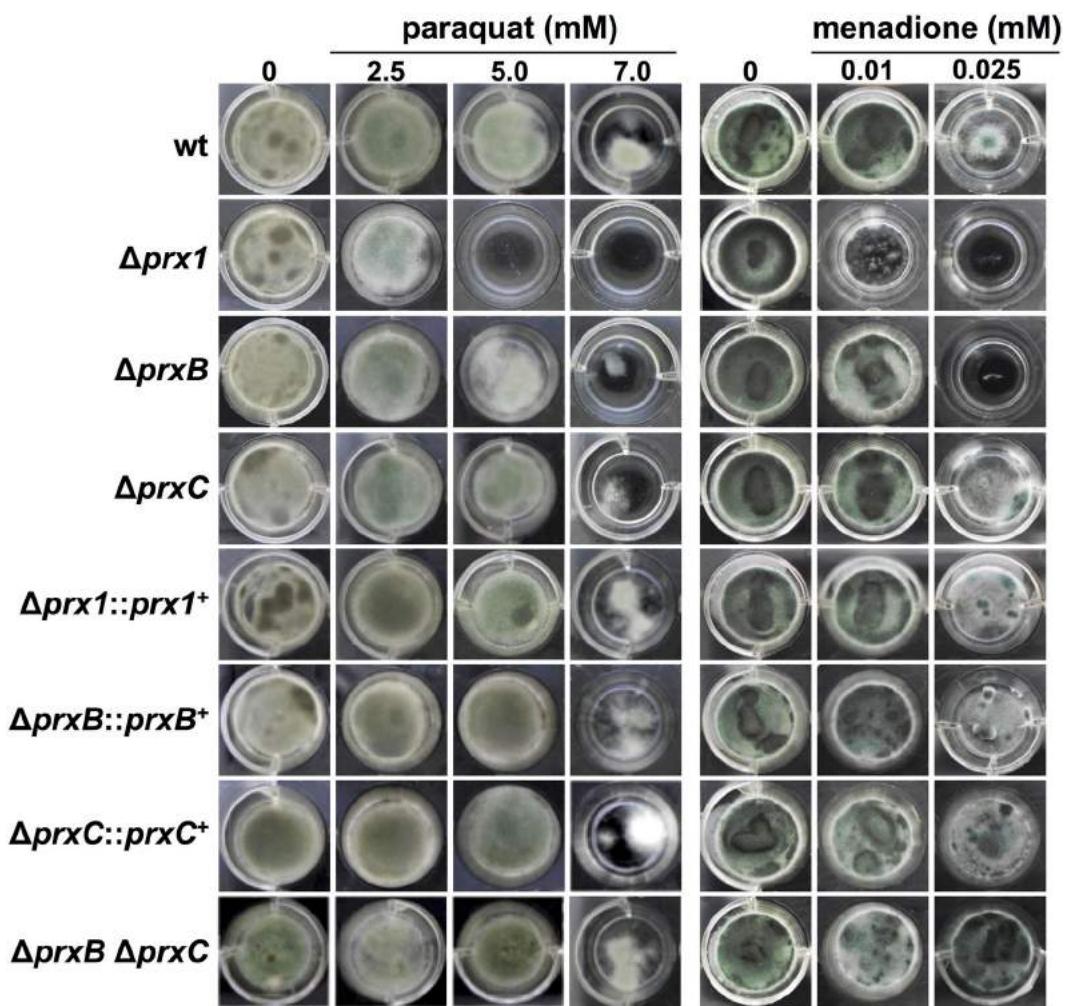


Figure 4. Prx null mutants are sensitive to oxidative-damaging agents. 1×10^4 conidia of wild-type, mutant and complemented strains were inoculated in 1 ml of MM (24 well plates) supplemented or not with varying concentration of paraquat and menadione. Plates were incubated at 37°C for 72 h and then photographed. Experiments were repeated three times and a representative result is shown.

Expression patterns of 1-Cys Prxs. To gain insights on the physiological roles of *A. fumigatus* 1-Cys Prxs, the expression patterns of their respective genes were characterized. Paraquat was chosen as the oxidant molecule since the single deletion mutants displayed increased sensitivity to this drug (Fig. 4). As a general trend, *prx1*, *prxB* and *prxC* genes were all induced by paraquat in a time dependent manner. However, there are considerable differences among them, such as the low induction of *prxC* (approximately 1.9-fold) in comparison to *prx1* (approximately 5.0-fold) (Fig. 6). Expressions of 1-Cys Prx genes in the mutant strains were also investigated and compensatory effects were observed only in few conditions. For instance, we observed an increase in *prxB* mRNA abundance 30 minutes after paraquat exposure in the $\Delta prx1$ strain. In contrast, the expression of *prxC* is comparable in the $\Delta prx1$ and wild-type strains.

To further analyze compensatory mechanisms, the expression of other antioxidant genes was evaluated, such as the catalases and superoxide dismutases^{39,40}. Furthermore, we analyzed the expression of the transcription factor *yap1* required for oxidative stress tolerance³⁰ and the putative mitochondrial cytochrome-c involved in the response to oxidative stress (yeast CCP1 homolog)³⁰. As expected, all the genes tested showed significant up-regulation after paraquat exposure (Supplementary Fig. S9). Since these antioxidant genes were still induced in the 1-Cys Prx deletion strains, no evidence for compensatory effects was obtained.

The expression of 1-Cys Prxs was also evaluated at the protein level by Western blot. The detected bands migrated as predicted by their aminoacid sequences fused with GFP (Fig. 7). The expression of Prx proteins increased in response to both H_2O_2 and paraquat, but following distinct patterns. Expression levels of Prx1 and PrxB progressively increased. Interestingly, PrxC abundance in non-stressing conditions was higher than PrxB, but PrxB was highly inducible. Indeed, the expression of PrxC follows a constitutive pattern, although in the case of paraquat, induction was observed for treatments at 2.5 mM concentration.

Prx1 is important for survival upon electron transport chain dysfunction. The role of the mitochondria and ROS in human fungal pathogenesis and drug resistance is an important area of investigation^{41–43}.

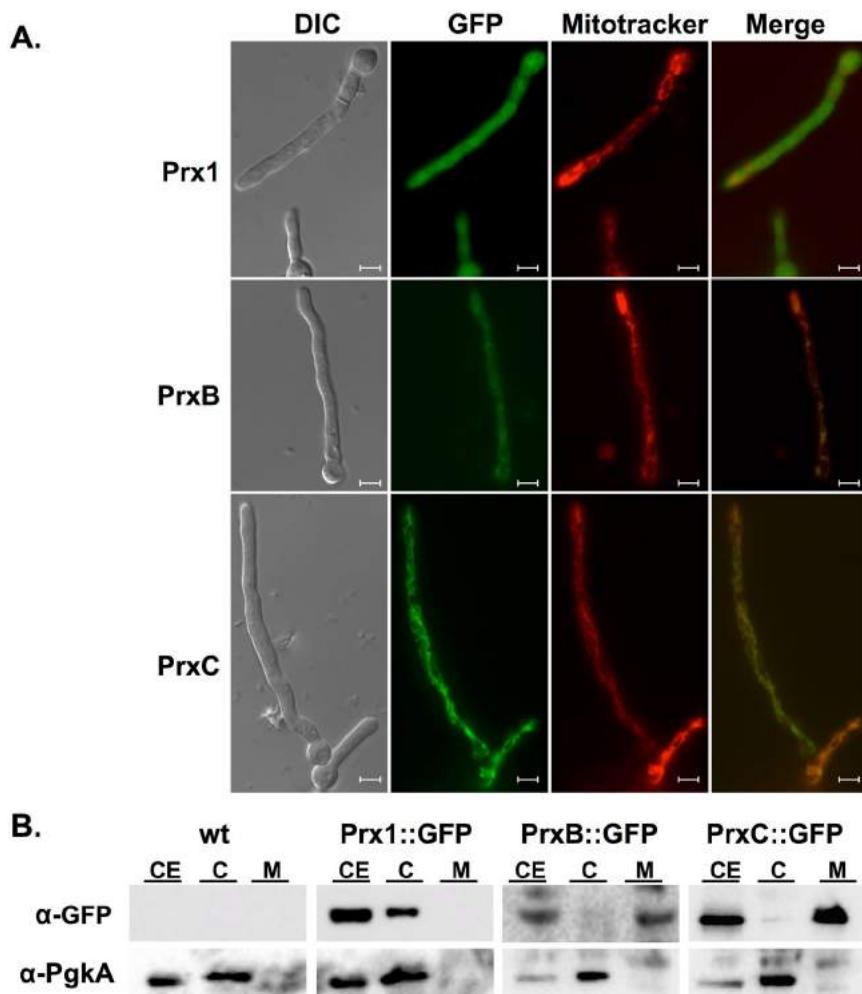


Figure 5. Prx1 localizes to the cytosol, while PrxB and PrxC are mitochondrial Prxs. (A) The Prx::GFP strains were grown for 16 h at 30°C in MM, stained with Mitotracker, washed and directly inspected under the fluorescence microscope. Bars: 5 μ m. (B) Western blot of the cytosolic and mitochondrial fractions of the Prx::GFP strains. CE: crude extract; C: cytosolic fraction; M: mitochondrial fraction. Prxs were detected by using an anti-GFP antibody. An anti-PgkA antibody served as fractionation control. Experiments were repeated three times and a representative result is shown. In the figure are reported the cropped gels/blots obtained by each protein evaluation. All gels were run in the same experimental conditions. Full-length blots are presented in Supplementary Figure S8.

Therefore, we examined the effects of pharmacological inhibitors of the electron transport chain on the viability of the 1-Cys Prx deficient strains. In the presence of varying concentrations of rotenone, antimycin A and the uncoupler FCCP [carbonyl cyanide 4-trifluoromethoxy phenylhydrazone], all three mutant strains presented sensitivity similar to wild-type cells (Supplementary Fig. S11). In contrast, the $\Delta prx1$ mutant displayed impaired tolerance to malonate, oligomycin and SHAM (salicylyhydroxamic acid), which inhibits complex II, FoF1-ATP synthase and the alternative oxidase (AOX), respectively (Fig. 8A and Supplementary Fig. S12), indicating an important role of Prx1 in cell adaptation under respiratory deficiency. Again, this phenotype was not observed in the double mutant $\Delta prxB \Delta prxC$, further suggesting a prominent function of *prx1*.

AOX plays a major role in limiting mitochondrial ROS formation and consequently oxidative stress in plants^{44,45} and in *A. fumigatus*^{41,46}. Therefore, we investigated if deletion of 1-Cys Prx genes could increase the expression of AOX from *A. fumigatus* (*AoxA*). Indeed, *aoxA* mRNA levels were twice to three times higher in the $\Delta prxB$ and $\Delta prxC$ mutants compared with the wild-type strain, in non-stressing condition (Fig. 8B). In contrast, only in the $\Delta prx1$ background, the *aoxA* gene was not induced by paraquat, suggesting a possible genetic interaction between Prx1 and AoxA. The lower levels of AoxA protein in the mitochondrial fractions found only for the $\Delta prx1$ mutant (when compared to the wild-type strain) further support this finding (Fig. 8C). It is possible that another factor is involved in the Prx1-AoxA interaction, as this Cys-based peroxidase is cytosolic and AoxA is mitochondrial.

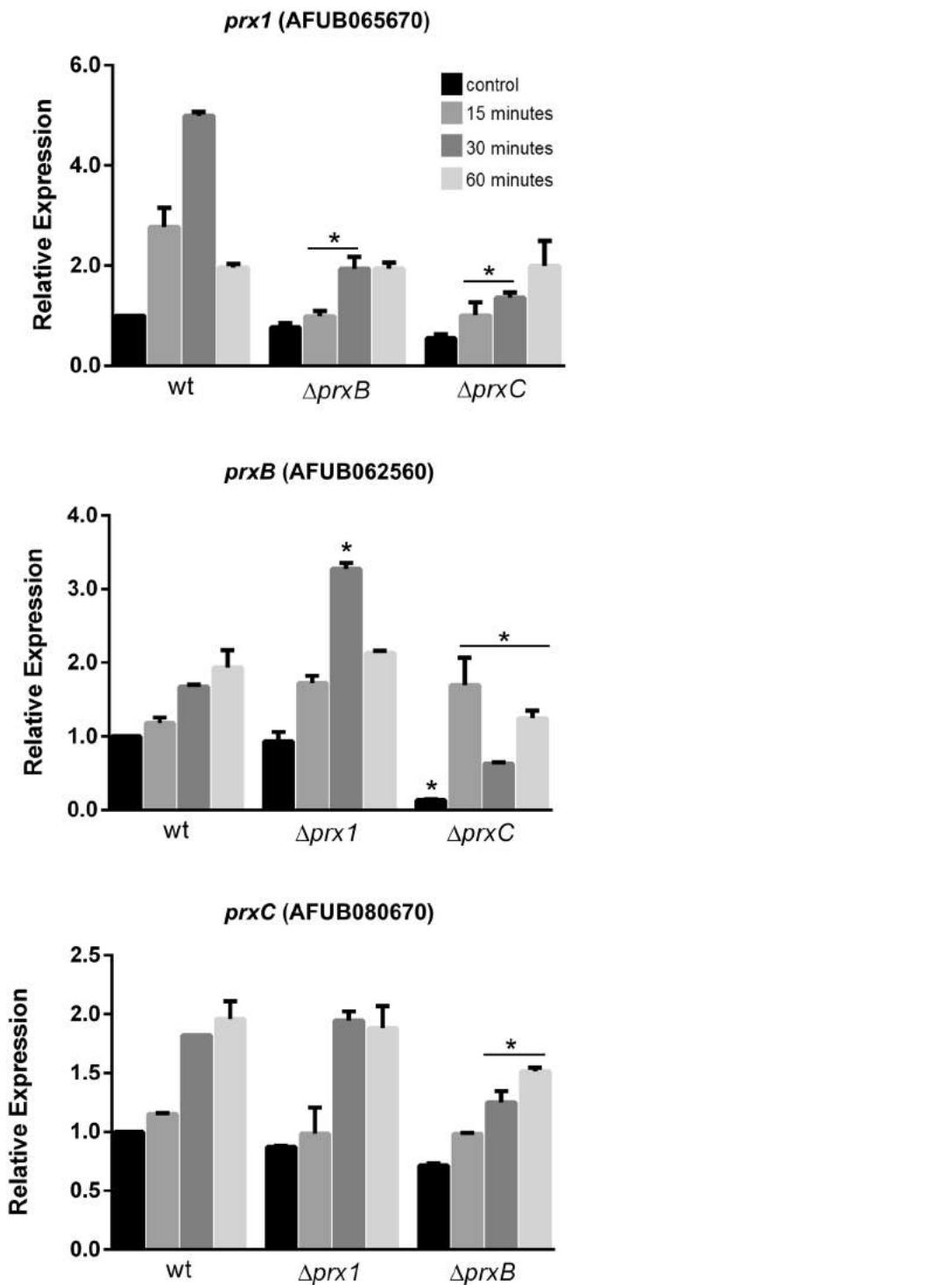


Figure 6. The transcriptional responses of Prxs in the presence of paraquat. Wild-type, $\Delta prx1$, $\Delta prxB$ and $\Delta prxC$ mutant strains were grown in MM for 24 h and subjected to treatment with 10 mM of paraquat for 15, 30 and 60 minutes while the control was left untreated. The mRNA abundance for each gene was assessed by RT-qPCR and normalized to β -tubulin. The fold increase in each strain represents the normalized mRNA abundance relative to the wild-type. The data represent the average value of at least three biological replicates, each of which was repeated in duplicate in the same run, Bar = SD, * $p \leq 0.05$ (one-way ANOVA).

The MAP kinase SakA and the Yap1 transcription factor mediate transcriptional regulation of 1-Cys Prxs. Since the expression levels of *A. fumigatus* 1-Cys Prxs increased upon oxidative challenge (Figs 6–7), we investigated other stressors of economic interest such as iprodione and fludioxonil, two crop fungicides. The mechanism of action of these compounds involves the hyperactivation of the HOG (High Osmolarity Glycerol) pathway and in *A. fumigatus*, SakA^{HOG1} and MpKc, two MAP kinases of the HOG pathway, are also involved

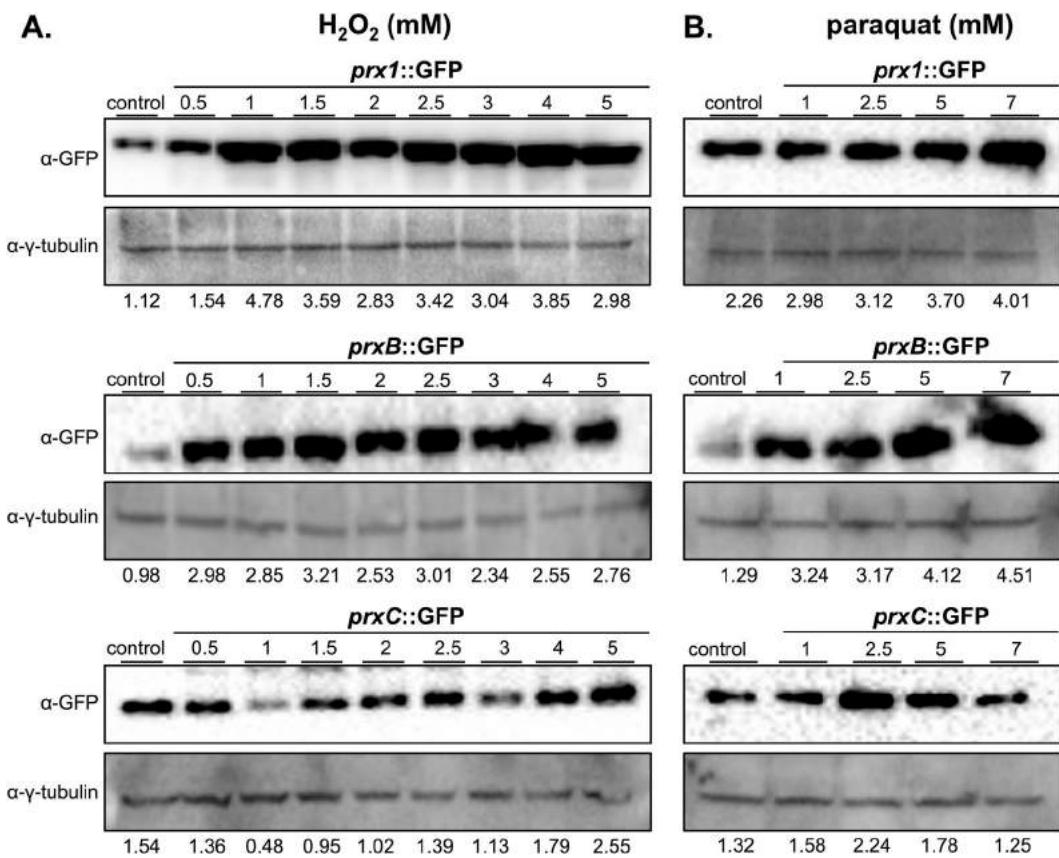


Figure 7. Prx1, PrxB and PrxC expression upon oxidative challenge. *Prx1::GFP*, *PrxB::GFP* and *PrxC::GFP* strains were grown for 24 hours in MM and subsequently exposed to increasing concentrations of H_2O_2 (**A**) or paraquat (**B**). The total amount of each protein was detected using an anti-GFP antibody. The anti- γ -tubulin antibody was used as a loading control. Densitometry analysis of Western blot signals is shown on the bottom of each image and represents the Prx/ γ -tubulin intensity ratio. The experiments were done in triplicate and a representative experiment is shown. In the figure are reported the cropped gels/blots obtained by each protein evaluation. All gels were run in the same experimental conditions. Full-length blots are presented in Supplementary Figure S10.

in iprodione and fludioxonil resistance^{47–51}. Here, we found that the expression of the three 1-Cys Prxs genes were up-regulated by fludioxonil in the wild-type strain; *prxB* achieving very high levels of induction by this drug (Fig. 9A). The inactivation of *sakA*, but not *mpkC*, significantly attenuated the transcriptional responses for all three Prxs to fludioxonil and paraquat ($p \leq 0.05$; Fig. 9A,B). Noteworthy, the expression of the three 1-Cys Prxs, especially the *prx1* gene, were even higher in the $\Delta mpkC$ mutant background in the presence of fludioxonil. Moreover, $\Delta prx1$ was the most sensitive mutant to fludioxonil and iprodione, although $\Delta prxB$ and $\Delta prxC$ were also less tolerant than the wild-type strain to these fungicides (Fig. 9C,D). Interestingly, there was an epistatic interaction between *prxB* and *prxC* for the tolerance to fludioxonil (Fig. 9C,D). The levels of SakA phosphorylation increased in the time course experiment of fludioxonil treatment in the wild-type strain (Supplementary Fig. S14). Further increase in SakA phosphorylation upon fludioxonil treatment was observed only in the $\Delta prx1$ background after 15 minutes of exposure, which again suggests a leading role of Prx1 in fludioxonil and ROS tolerance. Collectively, these results indicate that SakA/MpkC are important for 1-Cys Prx regulation in *A. fumigatus*.

Yap1 is a transcription factor described as a primary determinant in the antioxidant response in yeast (reviewed in⁵²). In *A. fumigatus*, the close homolog *yap1* is also involved in the response to oxidative challenge, but it is not required for virulence³⁰. Therefore, we analyzed whether the expression of *A. fumigatus* 1-Cys Prx genes could also occur in a Yap1-dependent manner. The transcriptional induction of *prxC* and especially of *prx1* by paraquat and fludioxonil were significantly reduced in the $\Delta yap1$ and $\Delta sakA$ strains (Fig. 9A,B). In contrast, the expression of *prxB* was only partially regulated by Yap1.

The $\Delta prx1$ strain has attenuated virulence in a neutropenic murine infection model. The involvement of the three 1-Cys Prxs in the pathogenicity of *A. fumigatus* was evaluated in a neutropenic murine model of invasive pulmonary aspergillosis. The $\Delta prx1$ infection resulted in a significant decrease in mortality rate, in a condition where wild-type infection resulted in 100% mortality 12 days post-infection (Fig. 10A). In contrast, no significant differences among the wild-type, $\Delta prxB$ and $\Delta prxC$ were observed in our experimental conditions (Fig. 10B). Virulence was fully restored in the $\Delta prx1::prx1^+$ complemented strain.

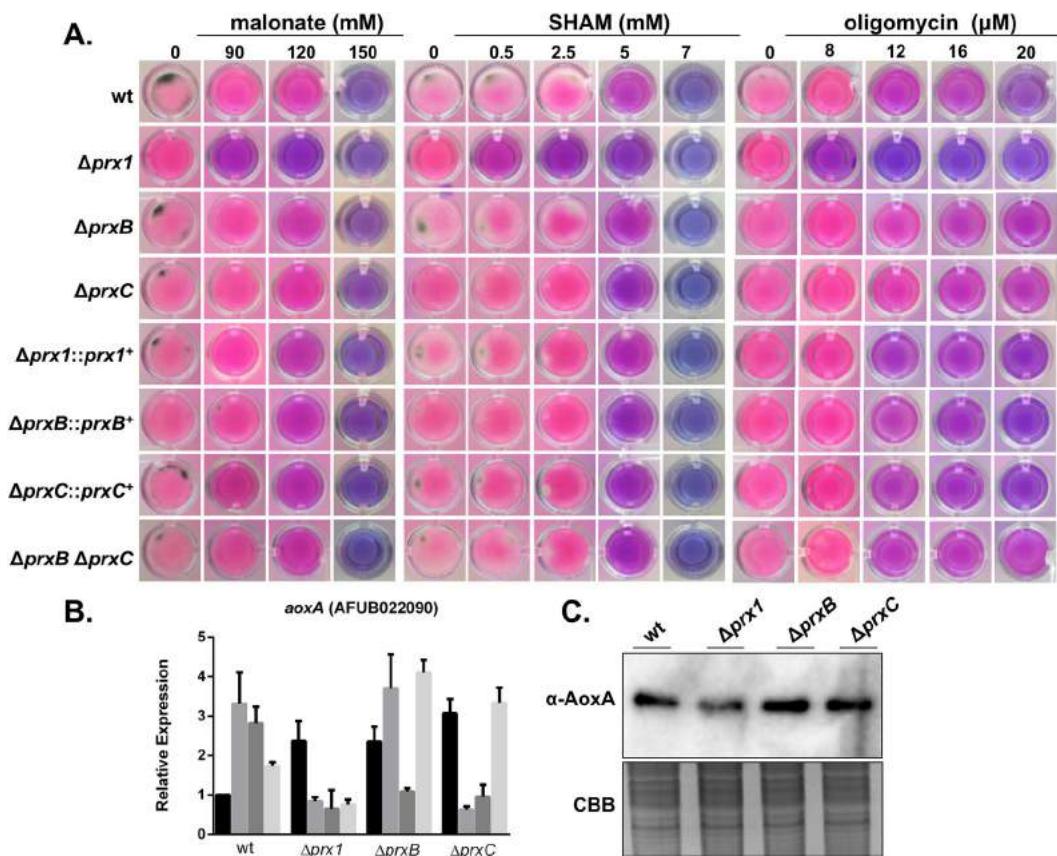


Figure 8. *A. fumigatus* Prx deletion mutants are sensitive to pharmacological inhibitors of the electron transport chain. (A) Viability of the germlings of the wild-type and Prx mutants in the presence of malonate, SHAM and oligomycin. Viability is shown by the indicator Alamar blue. Plates were incubated at 37 °C for 48 h and then photographed. A bluish color indicates decreased mitochondrial activity and therefore, lower viability. (B) Expression analysis of *aoxA* in the Prx null mutants in the presence of paraquat. The fold increase represents the normalized mRNA abundance relative to the wild-type strain. The data represent the average value of three biological replicates, Bar = SD, * $p \leq 0.05$. (C) Western blot for AoxA expression. Anti-AoxA was used to detect the total amount of AoxA (40.8 kDa) in the mitochondrial extract. A Coomassie Brilliant Blue (CBB) stained gel was used as a loading control for the mitochondrial enrichment. Experiments were run in triplicate with similar results. Image was cropped from that shown in Supplementary Figure S13.

In addition, we asked whether these mutations would affect the host immune response. To investigate whether the three 1-Cys Prxs could influence the internalizing and fungicidal activity of macrophages, we compared phagocytosis index and killing levels of Bone Marrow Derived Macrophages (BMDMs) among the wild-type, mutants and complemented strains. Corroborating the survival experiments, both the phagocytosis index (Fig. 10C) and the killing levels (Fig. 10D) were significantly increased in $\Delta prx1$ strain when compared to wild-type strain and complemented strains. Again, no significant differences were verified in these parameters for the $\Delta prxB$ and $\Delta prxC$ mutants. We also measured the levels of TNF- α , IL-1 β , and IL-12p40 from BMDMs after co-incubation with *A. fumigatus* conidia (Supplementary Fig. S15), but no significant differences were verified. Overall, these experimental observations suggest that Prx1 is part of the virulence arsenal of *A. fumigatus* and highlight the importance of 1-Cys Prxs in host-pathogen interactions.

Discussion

Tolerance to oxidative challenge is one of the most recognized determinants of virulence in several pathogens. Although several antioxidant genes and transcriptional regulators have been characterized in *A. fumigatus*^{30,39,40,53}, the exact contributions of these proteins in the cellular response to ROS remain elusive. This study, therefore, aimed to gain insights on how *A. fumigatus* antioxidant defenses are impacted by the peroxidase activity of 1-Cys Prxs.

We described here that Prx1, PrxB and PrxC hold the conserved PVC_PTTE motif of the 1-Cys Prxs (Prx6 subfamily), as well as a fully conserved Arg residue (Fig. 1). These features are related with extremely high efficiency of Prx1 and PrxC to reduce H₂O₂ (rate constants in the 10⁷ M⁻¹.s⁻¹ range, Fig. 2). In contrast, atypical 2-Cys Aspf3 from *A. fumigatus* presented rate constant several orders of magnitude lower (10⁴ M⁻¹.s⁻¹ range), but it should be considered that this parameter was obtained by steady state kinetics (*kcat/Km*), using heterologous proteins from *E. coli* to turn over the enzyme¹⁴.

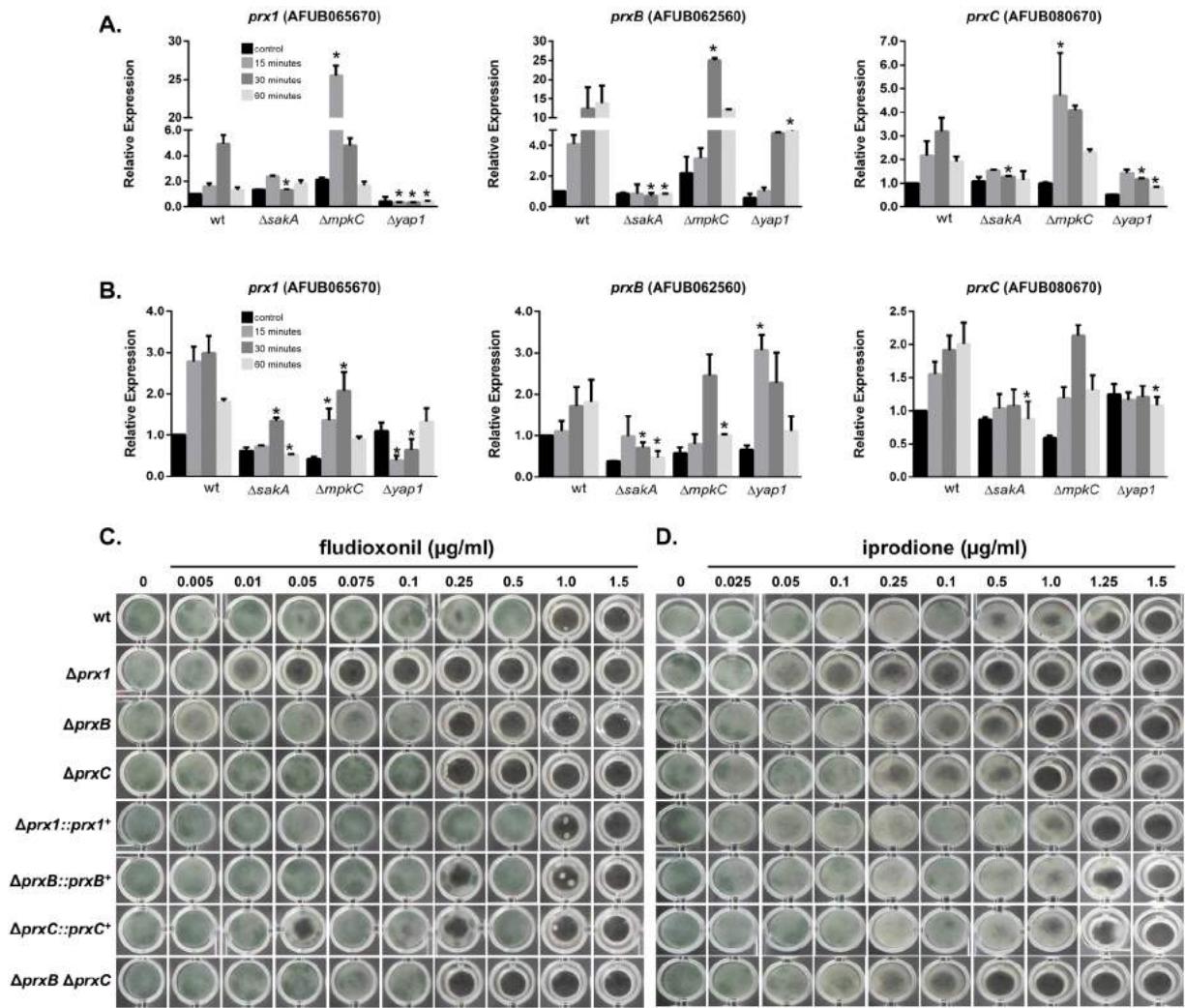


Figure 9. Expression of *A. fumigatus* Prxs is regulated by *sakA^{HOG1}* and *yap1^{YAP1}* in the presence of paraquat and fludioxonil. (A,B) mRNA abundance of *prx1*, *prxB* and *prxC* is impacted by the MAP kinase SakA while the expression of *prx1* and *prxC* is regulated by the Yap1 transcription factor. Wild-type, $\Delta sakA$, $\Delta mpkC$ and $\Delta yap1$ mutant strains were grown in MM for 24 h and subjected to treatment with fludioxonil (1 $\mu\text{g/ml}$; A) or paraquat (10 mM; B) for 15, 30 or 60 minutes. The control was left untreated. The mRNA abundance for each gene was assessed by RT-qPCR and normalized to β -tubulin. The data represent the average value of three biological replicates, each of which was repeated in duplicate in the same run, Bar = SD, * $p \leq 0.05$ (one-way ANOVA). (C,D) The Prx deletion mutants are more sensitive to fludioxonil and iprodione. 1 $\times 10^4$ conidia of each strain were grown on MM containing increasing concentrations of fungicides. The cultures were grown for 72 h at 37 °C. The results are representative of four independent experiments.

Nevertheless, Prx1 and PrxC seem to play a major role in H_2O_2 metabolism as these enzymes are highly reactive (Fig. 2) and also abundant (Figs 5–7). Accordingly, we observed that the Prx null mutants showed decreased tolerance to paraquat and menadione, two compounds that undergo redox cycling, generating a flux of H_2O_2 (Fig. 4). Unfortunately, we could not identify the nature of Prx1 and PrxC reducing agents, which is also the case for several others 1-Cys Prx. As other Prx enzymes, Prx1 and PrxC probably display a ping-pong mechanism and the determination of true K_m and k_{cat} parameters required the determination of rates at distinct concentrations of the reducing and oxidizing substrates.

Factors such as the regulation of gene expression, sub-cellular location and substrate affinity should determine specific roles for each 1-Cys Prx in the cellular response to H_2O_2 . Nevertheless, in most of the conditions analyzed herein, Prx1 appears to play major roles in the response of *A. fumigatus* to oxidative challenge. Noteworthy, recently we developed a device to electrochemically monitor the degradation of H_2O_2 in the microenvironment of *A. fumigatus* and indeed the efficiency of H_2O_2 degradation for the $\Delta prx1$ mutant was much lower (8%), in comparison to the wild-type strain (71%)⁵⁴.

The finding that *A. fumigatus* contains no typical 2-Cys Prx and three 1-Cys Prx enzymes is very unusual, since the majority of organisms possess only one functional copy of 1-Cys Prx. Therefore, we identified their sub-cellular localization to gain insights into their individual roles. In a previous proteomic study of both crude

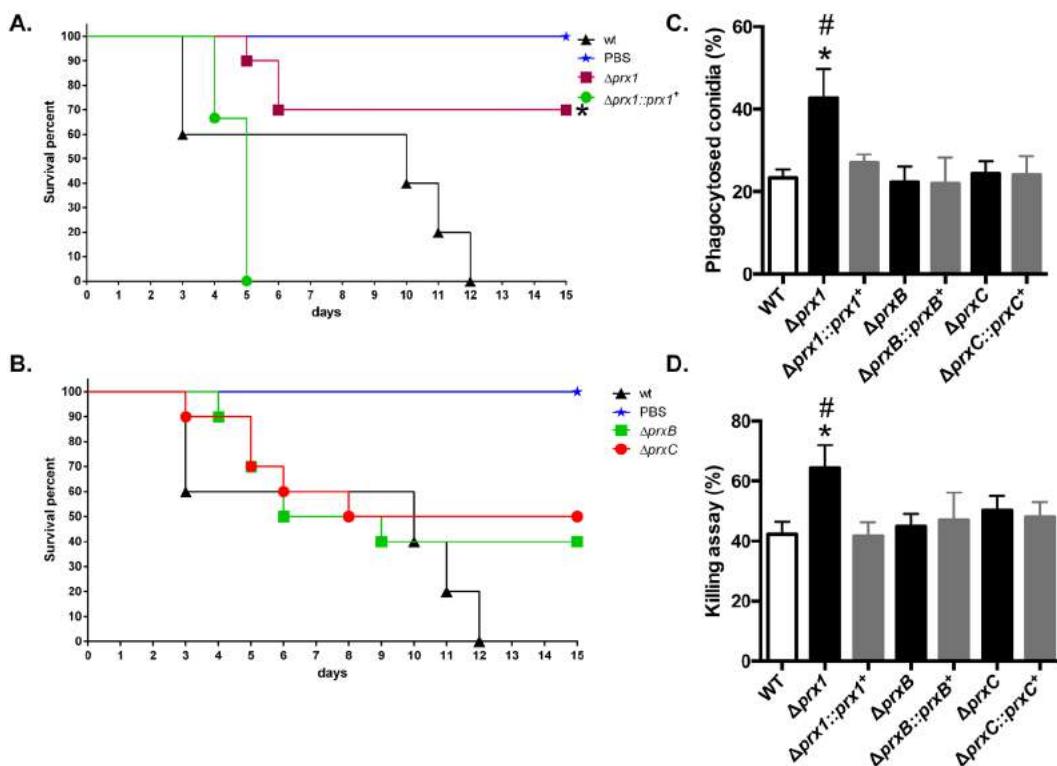


Figure 10. *A. fumigatus* Prx1, but not PrxB or PrxC contributes to virulence in a mouse model of invasive pulmonary aspergillosis. **(A,B)** Comparative analysis of wild-type and 1-Cys Prx mutant strains in a neutropenic murine model. No mock infected animals perished in either experiment. Survival of the mutant strain was compared to that of the wild-type and complemented strain. Infection experiments were repeated two times with similar results. Survival curves between the $\Delta prx1$ mutant and wild-type strain and mutant and reconstituted strains were statistically significant (* $p \leq 0.0132$ and $p \leq 0.0074$, respectively). No significant difference was observed between the wild-type and $\Delta prxB$ or $\Delta prxC$ deletion strains. Phagocytosis index (**C**) and killing activity (**D**) is increased in the *A. fumigatus* $\Delta prx1$ mutant strain. The results are expressed as means \pm SD for three independent experiments. * $p \leq 0.05$ compared to wild-type; # $p \leq 0.05$ compared to the complemented strain.

mycelial and mitochondrial protein extracts, Prx1 was detected only in the mycelial extract, PrxC was detected in both preparations, while no information was recovered for PrxB⁵⁵. These results were confirmed here as we further advanced in determining the specific sub-cellular localization of PrxB and PrxC compartmentalization (Fig. 5).

The mitochondrial repertoire of antioxidant enzymes is quite diverse, but generally Prx enzymes play central roles in the removal of H_2O_2 in this organelle. For instance, mitochondria of *S. cerevisiae* contains only one 1-Cys Prx⁵⁶ that is located in both matrix and intermembrane space⁵⁶, whereas mammalian organisms contain two 2-Cys Prx (Prx3 and Prx5). Noteworthy, human Prx3 decomposes 90% of the H_2O_2 generated within the mitochondrial matrix^{21,57,58}. N-termini cleavable leader sequences of a preprotein synthesized by cytosolic ribosomes is the classical type of mitochondrial targeting signals, as we observed for yeast Prx1 and *A. fumigatus* PrxC. However, additional non-cleavable targeting and sorting signals, which are located in the mature regions of mitochondrial proteins, have also been described^{59–61}. This could be the case of *A. fumigatus* PrxB since we could not detect a canonical cleavable N-terminal presequence for this protein.

ROS production derived from the leaking of electrons from the mitochondrial transport chain is a well-established phenomenon^{38,62,63}. However, these mechanisms are still scarcely understood in fungi, but there are evidences that the canonical mitochondrial respiratory pathway via cytochrome c or cyanide-resistant respiration (via AOX) impact fungal virulence and the host immune response^{41,46,64–66}. Intriguingly, cytosolic Prx1 is involved in the maintenance of mitochondrial homeostasis (Fig. 8). AOX is another system involved in the decreased accumulation of mitochondrial ROS in the response of plant and fungal cells to oxidative challenge^{41,42,44,67}. Curiously, we observed decreased levels of AoxA in the $prx1$ deletion mutant (Fig. 8B,C) what can partially accounts for the more pronounced cell susceptibility to oxidants in this mutant (Figs 4 and 8). A potential reason for this phenotype is if AoxA is depleted, H_2O_2 could accumulate in mitochondria and then diffuses to the cytosol⁶³. Thus, AoxA would act in parallel with Prx to counteract oxidative stress. Cytosolic Prx is important for Yap1 activation through nuclear localization in yeast^{68,69}. Loss of Prx1 in *A. fumigatus* might impact the general response to oxidative challenge. So, in the absence of $prx1$, response of H_2O_2 would be decreased and levels of this oxidant should be higher in deletion mutant for *aoxA*. Confirmation of this hypothesis awaits further experimentation.

Unlike the core components of fungal respiration, the fungal AOX appears to have complex mechanisms for regulation of expression and enzyme activity which are remarkably different from plants^{42,67}. Thus, a further understanding of how AOX and 1-Cys Prx activities are regulated across fungi can yield insights about the consequences for the fungal cell under accumulation of hydroperoxides.

In addition, all three 1-Cys Prxs are regulated by the HOG pathway and appear to cooperate in the response of the fungi to the crop fungicides (Fig. 9). Hyperactivation of the HOG pathway is the mechanism that explains cell death in yeast and *C. neoformans* while perturbations in any of the three components of the HOG pathway render *C. neoformans* highly resistant to fludioxonil^{50,51}. Similarly, Hog1 mutants in *S. cerevisiae* and other filamentous fungi are also resistant to these drugs^{70–73}. Although in *A. fumigatus* mutants for both *sakA*^{HOG1} and *mpkC* were slightly more resistant to fludioxonil⁴⁹, we observed increased activation of SakA in the $\Delta prx1$ mutant (Supplementary Fig. S14). Our data indicated that SakA, and not MpKc, is necessary for the expression of 1-Cys Prxs during exposure to fludioxonil. Expression of *prx1* and *prxC* is also regulated by Yap1 (Fig. 9A,B), a transcriptional regulator that is redox regulated in yeast⁷⁴. Accordingly, here we also identified *in silico* a conserved binding motif for Yap1 in the promoter regions of the three *A. fumigatus* 1-Cys Prxs (Figure S16). Functional validation of these predicted binding motifs in the transcriptional activation of the 1-Cys Prxs awaits further experimentation. A previous genome-wide study also observed that PrxC is down-regulated in a $\Delta yap1$ mutant exposed to H_2O_2 ³⁰. How the distinct signaling pathways (HOG and Yap1) interact to integrate the responses of this pathogenic fungus to stressful conditions awaits further investigation.

Importantly, we observed that Prx1 is required for *A. fumigatus* virulence in our mouse model (Fig. 10). Based on data presented by this study and others^{14,75}, Prx-enzymes emerge playing leading roles in *A. fumigatus* protection against host defenses. For instance, neither a triple *sod* mutant nor individual deletion of catalases significantly causes virulence attenuation in *A. fumigatus*^{39,40,53}. In addition, since mammalian 1-Cys Prx (Prx6) presents acidic Ca^{2+} -independent phospholipase A2 activity^{24,25}, it is possible that such putative activity in the *A. fumigatus* 1-Cys Prxs might also contribute to the fitness of the pathogen inside the host. Altogether, we cannot rule out the possibility that PrxB and PrxC are also important for virulence under other experimental conditions or additional animal models. Remarkably, BMDMs stimulated with $\Delta prx1$ showed enhanced phagocytosis and killing levels. Although this finding is consistent with the survival experiments, the verified cytokines levels were not significant among the analyzed mutants (Supplementary Fig. S15). Probably the possible modifications in the tolerance of *A. fumigatus* to oxidative damage could promote an unbalance at the phagolysosome acidification during phagocytosis and killing, but were not enough to increase the recognition of the mutated fungus by dectin-1 receptor, which would promote an exacerbated production of pro-inflammatory cytokines. Reactive oxidant intermediates have been demonstrated involved in the inhibited killing of *A. fumigatus* without affecting the uptake rate⁷⁶. Also, the mechanisms of conidia killing by oxidation are still elusive since the available data in the literature for killing of *A. fumigatus* by macrophages are very unrelated⁷⁶.

Taken together, our studies uncovered that the three 1-Cys Prxs act together in the *A. fumigatus* response to oxidative challenge with Prx1 playing a major role in virulence. We argue that further characterization of additional biochemical properties of the 1-Cys Prxs, the identification of their potential interacting proteins and understanding the mechanisms whereby they are reduced *in vivo* will help us to elucidate how *A. fumigatus* relies on 1-Cys Prxs to cope with ROS arising from its own metabolism and from the host during the course of infection.

Methods

Cloning the 1-Cys Prx genes. Sequence analysis of the *A. fumigatus* 1-Cys Prx were performed as described in Supplementary Methods. Prx cDNA sequences were obtained from a paraquat-induced culture of CEA17 wild-type strain. RT-PCR was run using the primer sets described in Supplementary Table S1. The PCR products were cloned into the pTZ57R/T easy vector (Thermo Scientific) and subcloned into the pET15b expression vector at the *NdeI* and *BamHI* sites using standard protocols⁷⁷. The pET15b/*prx1*, pET15b/*prxB* and pET15b/*prxC* clones were validated by fully sequencing.

Protein expression and purification. Single colonies of *E. coli* BL21(DE3) harboring pET15b/*prx1* or pET15b/*prxC* were cultured in LB (100 μ g/ml ampicillin) and grown for 16 hours (37 °C) in an orbital shaker (250 rpm). The culture was diluted in 1 L of LB (100 μ g/ml ampicillin) and cultured at 37 °C until the OD₆₀₀ reached 0.6–0.8. IPTG was then added to a final concentration of 0.3 mM and the culture was incubated at 37 °C for an additional 3 h (250 rpm). Cells were harvested by centrifugation, and the pellet was washed and suspended in the start buffer (20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4; 500 mM NaCl; 20 mM imidazole; 625 μ M PMSF). Twenty cycles of 15 s of sonication (30% amplitude) following 40 s in ice were applied to cell suspensions. Cell extracts were kept on ice during streptomycin sulfate 1% treatment for 15 min and the suspension was centrifuged at 15,000 rpm for 45 min to remove nucleic acid precipitates and the insoluble fraction. Finally, cell extracts were filtered and purified by immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC; HiTrap column GE Healthcare) using ÄKTA FPLC (GE Healthcare).

The conditions of protein purification were optimized using the gradient procedure for imidazole concentration as described by the manufacturer. Imidazole was removed from purified proteins by gel filtration using a PD10 column (GE Healthcare). Purified proteins were stocked in 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) containing 500 mM NaCl. Recombinant protein concentrations were determined spectrophotometrically at 280 nm. The extinction coefficients for reduced Prx1 ($\epsilon_{280} = 20,970 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) and PrxC ($\epsilon_{280} = 22460 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) were determined using the ProtParam tool (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>).

Determination of the peroxidase activity by competitive kinetics. The second-order rate constant for the reaction between Prx1 and PrxC with H₂O₂ was determined by competition with horseradish peroxidase (HRP)^{33,78}. The Prxs were first reduced with 20 mM DTT during 16 hours at 4°C and desaluted twice using a PD10 column. Following incubation, the amount of free thiols was determined using DTNB [5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid); D8130 Sigma-Aldrich] (10 DTNB: 1 protein) under denaturing conditions ($\epsilon_{412} = 13,600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) in order to obtain the percentage of reduced protein, which was kept at above 90%. The concentration of HRP (P6782 Sigma-Aldrich) was determined spectrophotometrically using $\epsilon_{403} = 102,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. In reaction mixtures containing 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4), 0.1 mM DTPA (diethylene-triaminepentaacetic acid, D6518 Sigma-Aldrich), 8.0 μM HRP and various concentrations of pre-reduced Prx (2–16 μM), H₂O₂ was added to a final concentration of 4.0 μM at 37°C. The extent of the conversion to compound I was determined by measuring the absorbance at 403 nm before and after 30 seconds of adding H₂O₂. Results shown are mean ± SD obtained from three independent replicates.

Cell fractionation. For the extraction of mitochondrial proteins, mitochondria were isolated from *A. fumigatus* cells based on the previous methodology⁵⁵. Mycelia (10 g wet weight) were obtained by growing 1×10^8 conidia of *prx1::gfp*, *prxB::gfp* or *prxC::gfp* strains for 16 h at 37°C in 100 ml of YG. Cells were harvested, frozen in liquid nitrogen and subjected to cell fractionation procedures. 20 μg of protein from each sample were loaded on 12% SDS-PAGE and electroblotted to PVDF (polyvinylidene difluoride) membranes, which were then analyzed by Western blot using anti-GFP antibody.

Strains and media. The *A. fumigatus* strains used in this study are described in Supplementary Table S2. Strains were grown in either complete medium (YG; 2% [wt/vol] glucose, 0.5% [wt/vol] yeast extract, trace elements) or minimal medium (MM; 1% [wt/vol] glucose, 1 × original high-nitrate salts, trace elements, pH 6.5). Trace elements, vitamins, and nitrate salt compositions were as described previously^{79,80}. Solid YG and MM were the same as described above except that 2% (wt/vol) agar was added. When necessary, uridine and uracil (1.2 g/liter) were added. For all the phenotypic and expression analyses, MM was used to avoid the side reactions of peroxides with extracellular components present in a rich medium^{81,82}. To induce oxidative stress, 1×10^7 conidia from wild-type and mutant strains were incubated in 50 ml of liquid MM for 24 hours, at 37°C. Following incubation, strains were challenged to increasing concentrations of H₂O₂ or paraquat for 30 min. Alternatively, paraquat (10 mM) or fludioxonil (1 μg/ml) was added to the cultures, and they were incubated for an additional 15, 30 or 60 min. The control was left untreated. Mycelia were collected and stored as described previously⁸³.

Generation of 1-Cys Prx mutant strains and Southern blot analyses. The gene replacement cassettes used in this study were constructed by *in vivo* recombination in *S. cerevisiae* as reported previously⁸⁰ and are described in detail in the Supplementary Methods. Primers used for each mutant construction are described in Supplementary Table S3.

Susceptibility assays against oxidative damaging agents and antifungals. To monitor growth of the mutant strains under drugs that cause oxidative stress 1×10^4 conidia of each strain were grown in 1 ml of liquid MM in 24-well plates that were supplemented with varying concentrations of paraquat, menadione, iprodione and fludioxonil. The plates were incubated for 72 hours at 37°C and photographed. The same assay was used to test the tolerance to pharmacological inhibitors of the electron transport chain, however using 1×10^4 conidia of each strain grown in 200 μl of liquid MM (96-well plates) that were supplemented with varying concentrations of each compound. In these experiments, we used 10% Alamar blue (Thermo Scientific) as viability indicator, according to the procedures described previously⁸⁴. The plates were incubated for 72 hours at 37°C and photographed.

To generate the survival curves of the wild-type and mutant strains in the presence of oxidants (paraquat and menadione) and the electron transport chain inhibitors (malonate, SHAM and oligomycin), 1×10^4 conidia of each strain were grown in 200 μl of liquid MM in black 96-well plates (CellStar 650086). Fluorescence intensities ($\lambda = 590 \text{ nm}$) of treated and untreated samples for each strain were obtained using a Spectra Max SpectraMax i3 (Molecular Devices) after 24, 48 and 72 hours of incubation at 37°C and used to calculate the percentage of growth, according to the manufacturer's protocol (Thermo Fisher #DAL1100).

Sensitivity to the oxidative damage generated by H₂O₂ was evaluated by an inhibition zone assay on MM agar plates, as described previously³⁰. Alternatively, to test the susceptibility of the strains to antifungal drugs, serial dilutions of wild-type and null mutant conidia were spotted onto agar plates.

RNA extraction and gene expression analysis. The total RNA obtained upon cell treatments with paraquat or fludioxonil was extracted and processed for cDNA synthesis as previously described⁸³. The primers for the individual genes are listed in Supplementary Table S4. Three independent biological replicates were used and the relative fold change in mRNA quantity was calculated using comparative cycle threshold (Ct) ($\Delta\Delta\text{Ct}$) analysis⁸⁵. All values were normalized to the expression of the *A. fumigatus* *tubA* gene. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA with Tukey's *post hoc* test to assess differences in the mutant strains compared to the same growth condition in the wild-type strain ($p \leq 0.05$).

Immunoblot analysis. The GFP-tagged Prx strains either non-stressed or exposed to H₂O₂ or paraquat were used to assess the sub-cellular localization and protein abundance. Protein extraction and quantification was performed as described previously⁸³. 20 μg of protein from each sample were resolved in a 12% (w/v) SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes (BioRad). Detailed information about the conditions used for anti GFP (G1544; Sigma), Anti-γ-tubulin (yN-20; Santa Cruz Biotechnology), Anti *S. cerevisiae* Pgk1 (NE130/7S;

Nordic-Immunology), anti-phospho-p38 MAPK or anti-p38 MAPK (9211 and 9212, respectively; Cell Signaling Technologies) and anti-alternative oxidase (AoxA) (a gift from Drs. Sergio Akira Uyemura and Taisa Magnani Dinamarco, USP, Brazil; unpublished) are described in Supplementary Methods.

Microscopy. Prx1::GFP, PrxB::GFP and PrxC::GFP conidia were cultivated on 35 mm Glass-Botton dishes (MatTek Corporation) in 2 ml of MM for 16 h at 30 °C. For co-localization experiments, germlings were co-stained with MitoTracker DeepRed (Thermo Scientific) as described previously⁸⁶. Coverslips were inspected on Observer Z1 fluorescence microscope (Carl Zeiss). GFP and Mitotracker DeepRed were visualized using 38 HE and 63 HE filter sets (Carl Zeiss), respectively. DIC (differential interference contrast) and fluorescent images were captured with an AxioCam camera (Carl Zeiss) and processed using AxioVision software.

Virulence assay. The virulence of *A. fumigatus* strains was analyzed using a murine model for invasive aspergillosis, as detailed previously⁸⁷. Outbreed female mice (BALB/c strain; body weight, 20 to 22 g) were housed in vented cages containing five animals. The mice were immunosuppressed with cyclophosphamide at 150 mg/kg body weight, which was administered intraperitoneally on days -4, -1, and 2 prior to and post-infection. Hydrocortisone acetate (200 mg/kg) was injected subcutaneously on day -3. The *A. fumigatus* conidia that were used for inoculations were grown on solid YG medium for 2 days prior to infection. The conidia were freshly harvested in PBS and filtered using Miracloth (EMD Millipore). Conidial suspensions were spun for 5 min at 3,000 x g, washed three times with PBS, counted using a hemocytometer, and resuspended at a concentration of 5×10^6 conidia/ml. Viable counts of the administered inocula were determined, following serial dilution, by plating on solid YG medium, and the conidia were grown at 37 °C. The mice (10 animals) were anesthetized by halothane inhalation and infected through intranasal instillations of 1×10^5 conidia in 20 µl of PBS. For the negative control, a group of 10 mice received sterile PBS only. Mice were weighed every 24 hours starting from the day of infection and visually inspected twice daily. The statistical significance of comparative survival values was calculated using the Prism statistical analysis package by using Log-rank (Mantel-Cox method) and the Gehan-Breslow-Wilcoxon test.

Ethics statement. This study and all protocols involving animal care were approved by the local Ethics Committee for Animal Experiments (Campus of Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; Permit Number: 08.1.1277.53.6). All animals were housed within individually ventilated cages and were cared for in strict accordance with the principles outlined by the Brazilian College of Animal Experimentation (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, COBEA) and Guiding Principles for Research Involving Animals and Human Beings, American Physiological Society. The principles that guided our studies were based on the Declaration of Animal Rights ratified by the UNESCO in January 27, 1978 (8th and 14th articles). All efforts were made to minimize suffering. The animals were humanely sacrificed if moribund (as defined by lethargy, dyspnea, hypothermia and weight loss). All stressed animals were sacrificed by cervical dislocation.

Bone marrow-derived macrophages (BMDMs) preparation, phagocytosis and killing assay. All experiments with macrophages in this study were performed with BMDMs. The BMDMs preparation was performed according to⁸⁸ with slight modifications. BMDMs were prepared from C57BL/6 adult mice femurs and tibias after flushing with RPMI medium to release bone marrow cells. These cells were cultured for 6 days in RPMI 1640 medium supplemented with 20% fetal cow serum (FCS) and 30% L-929 cell conditioned medium. Non-adherent cells were removed and the adherent cells (majority macrophages) were removed and washed twice with cold PBS. Cell concentration was determined using a Neubauer chamber.

The phagocytic assay was performed as previously described⁸⁹ with slight modifications. In 24-well microplates at 37 °C with 5% CO₂, 1 ml of RPMI-FCS containing 1×10^5 conidia (1:5 macrophage/conidia ratio) was added and incubated for 90 min. The supernatant was removed and added 0.5 ml of 3.7% formaldehyde-PBS. The samples were washed with ultrapure water and incubated for 20 min with 495 µl of water and 5 µl of CFW (10 mg/ml). The samples were washed and mounted on slides with 50% glycerol. The images were acquired on a fluorescence microscope Eclipse E800 (Nikon Instruments), and the phagocytosis index calculated counting at least 100 conidia per sample. The experiments were repeated in triplicate.

To assess conidial killing, the phagocytic cells were obtained as described above. Subsequently, 1×10^5 conidia (1:5 macrophage/conidia ratio) were incubated at 37 °C with 5% CO₂ for 4 h. As positive control, conidia without BMDMs were used. The 24-well microplates were centrifuged for 10 min at 3,500 rpm, and the culture supernatant removed. Then, 100 µl of 1% Triton X-100 were added. After 10 min at room temperature, samples were removed from the microplate and serially diluted in PBS. The dilutions were plated and incubated at 37 °C for 48 h. The percentage of conidial killing was calculated by the measurement of colony forming units (CFU) numbers carried out after macrophage lysis, compared from samples incubated with macrophages to CFU numbers from those incubated without macrophages. The experiments were repeated three times, each performed in triplicate.

Cytokine measurements. Cytokines were measured by capture enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as previously described⁹⁰ with antibody pairs purchased from BD Biosciences. Supernatants were used to quantify the levels of TNF-α, IL-1β, and IL-12p40. The amount of cytokine was determined from standard curves, using murine recombinant cytokines as standards. Data are the average of at least three independent experiments, each performed in triplicate.

Data Availability. All data generated or analyzed during this study are included in this published article (and its Supplementary Information files).

References

- Brown, G. D. *et al.* Hidden killers: human fungal infections. *Sci Transl Med* **4**, 165rv113, <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004404> (2012).
- Kosmidis, C. & Denning, D. W. Republished: The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. *Postgrad Med J* **91**, 403–410, <https://doi.org/10.1136/postgradmedj-2014-206291rep> (2015).
- Heller, J. & Tudzynski, P. Reactive oxygen species in phytopathogenic fungi: signaling, development, and disease. *Annu Rev Phytopathol* **49**, 369–390, <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-072910-095355> (2011).
- Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C. *Free radicals in biology and medicine*. Fifth edition. edn, (Oxford University Press, 2015).
- Nathan, C. & Shiloh, M. U. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 8841–8848 (2000).
- Zahrt, T. C. & Deretic, V. Reactive nitrogen and oxygen intermediates and bacterial defenses: unusual adaptations in Mycobacterium tuberculosis. *Antioxidants & redox signaling* **4**, 141–159, <https://doi.org/10.1089/152308602753625924> (2002).
- Alegria, T. G. *et al.* Ohr plays a central role in bacterial responses against fatty acid hydroperoxides and peroxynitrite. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **114**, E132–E141, <https://doi.org/10.1073/pnas.1619659114> (2017).
- Imlay, J. A. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. *Nat Rev Microbiol* **11**, 443–454, <https://doi.org/10.1038/nrmicro3032> (2013).
- Breitenbach, M., Weber, M., Rinnerthaler, M., Karl, T. & Breitenbach-Koller, L. Oxidative stress in fungi: its function in signal transduction, interaction with plant hosts, and lignocellulose degradation. *Biomolecules* **5**, 318–342, <https://doi.org/10.3390/biom5020318> (2015).
- Paiva, C. N. & Bozza, M. T. Are reactive oxygen species always detrimental to pathogens? *Antioxidants & redox signaling* **20**, 1000–1037, <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5447> (2014).
- Jaeger, T. Peroxiredoxin systems in mycobacteria. *Sub-cellular biochemistry* **44**, 207–217 (2007).
- Mir, A. A. *et al.* Systematic characterization of the peroxidase gene family provides new insights into fungal pathogenicity in Magnaporthe oryzae. *Sci Rep* **5**, 11831, <https://doi.org/10.1038/srep11831> (2015).
- Kaihami, G. H. *et al.* Involvement of a 1-Cys peroxiredoxin in bacterial virulence. *PLoS pathogens* **10**, e1004442, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004442> (2014).
- Hillmann, F. *et al.* The Crystal Structure of Peroxiredoxin Asp f3 Provides Mechanistic Insight into Oxidative Stress Resistance and Virulence of Aspergillus fumigatus. *Sci Rep* **6**, 33396, <https://doi.org/10.1038/srep33396> (2016).
- Srinivasa, K. *et al.* Characterization of a putative thioredoxin peroxidase prx1 of Candida albicans. *Molecules and cells* **33**, 301–307, <https://doi.org/10.1007/s10059-012-2260-y> (2012).
- Urban, C. *et al.* The moonlighting protein Tsal p is implicated in oxidative stress response and in cell wall biogenesis in Candida albicans. *Molecular microbiology* **57**, 1318–1341, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04771.x> (2005).
- Reyes, A. M. *et al.* PrxQ B from Mycobacterium tuberculosis is a monomeric, thioredoxin-dependent and highly efficient fatty acid hydroperoxide reductase. *Free radical biology & medicine* **101**, 249–260, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.10.005> (2016).
- Tairum, C. A. *et al.* Catalytic Thr or Ser Residue Modulates Structural Switches in 2-Cys Peroxiredoxin by Distinct Mechanisms. *Sci Rep* **6**, 33133, <https://doi.org/10.1038/srep33133> (2016).
- Horta, B. B., de Oliveira, M. A., Discola, K. F., Cussiol, J. R. & Netto, L. E. Structural and biochemical characterization of peroxiredoxin Qbeta from Xylella fastidiosa: catalytic mechanism and high reactivity. *The Journal of biological chemistry* **285**, 16051–16065, <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.094839> (2010).
- Rhee, S. G. & Kil, I. S. Multiple Functions and Regulation of Mammalian Peroxiredoxins. *Annu Rev Biochem*, <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014431> (2017).
- Cox, A. G., Winterbourn, C. C. & Hampton, M. B. Mitochondrial peroxiredoxin involvement in antioxidant defence and redox signalling. *The Biochemical journal* **425**, 313–325, <https://doi.org/10.1042/BJ20091541> (2009).
- Chae, H. Z., Uhm, T. B. & Rhee, S. G. Dimerization of thiol-specific antioxidant and the essential role of cysteine 47. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 7022–7026 (1994).
- Rhee, S. G., Chae, H. Z. & Kim, K. Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free radical biology & medicine* **38**, 1543–1552, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.02.026> (2005).
- Chen, J. W., Dodia, C., Feinstein, S. I., Jain, M. K. & Fisher, A. B. 1-Cys peroxiredoxin, a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A2 activities. *The Journal of biological chemistry* **275**, 28421–28427, <https://doi.org/10.1074/jbc.M005073200> (2000).
- Nevalainen, T. J. 1-Cysteine peroxiredoxin: A dual-function enzyme with peroxidase and acidic Ca²⁺-independent phospholipase A2 activities. *Biochimie* **92**, 638–644, <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.01.019> (2010).
- Angelucci, F. *et al.* Typical 2-Cys peroxiredoxins in human parasites: Several physiological roles for a potential chemotherapy target. *Mol Biochem Parasitol* **206**, 2–12, <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2016.03.005> (2016).
- Jeelani, G. & Nozaki, T. Entamoeba thiol-based redox metabolism: A potential target for drug development. *Mol Biochem Parasitol* **206**, 39–45, <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2016.01.004> (2016).
- Pineyro, M. D., Parodi-Talice, A., Arcari, T. & Robello, C. Peroxiredoxins from Trypanosoma cruzi: virulence factors and drug targets for treatment of Chagas disease? *Gene* **408**, 45–50, <https://doi.org/10.1016/j.gene.2007.10.014> (2008).
- Harper, A. F. *et al.* An Atlas of Peroxiredoxins Created Using an Active Site Profile-Based Approach to Functionally Relevant Clustering of Proteins. *PLoS Comput Biol* **13**, e1005284, <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005284> (2017).
- Lessing, F. *et al.* The Aspergillus fumigatus transcriptional regulator AfYap1 represents the major regulator for defense against reactive oxygen intermediates but is dispensable for pathogenicity in an intranasal mouse infection model. *Eukaryotic cell* **6**, 2290–2302, <https://doi.org/10.1128/EC.00267-07> (2007).
- Wood, Z. A., Poole, L. B. & Karplus, P. A. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science* **300**, 650–653, <https://doi.org/10.1126/science.1080405> (2003).
- Pedrajas, J. R., Miranda-Vizcute, A., Javanmardi, N., Gustafsson, J. A. & Spyrou, G. Mitochondria of Saccharomyces cerevisiae contain one-conserved cysteine type peroxiredoxin with thioredoxin peroxidase activity. *The Journal of biological chemistry* **275**, 16296–16301 (2000).
- Toledo, J. C. Jr. *et al.* Horseradish peroxidase compound I as a tool to investigate reactive protein-cysteine residues: from quantification to kinetics. *Free radical biology & medicine* **50**, 1032–1038, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.02.020> (2011).
- Tairum, C. A. *et al.* Disulfide biochemistry in 2-cys peroxiredoxin: requirement of Glu50 and Arg146 for the reduction of yeast Tsal by thioredoxin. *J Mol Biol* **424**, 28–41, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.09.008> (2012).
- Flohe, L., Toppo, S., Cozza, G. & Ursini, F. A comparison of thiol peroxidase mechanisms. *Antioxidants & redox signaling* **15**, 763–780, <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3397> (2011).
- Vetrano, A. M. *et al.* Characterization of the oxidase activity in mammalian catalase. *The Journal of biological chemistry* **280**, 35372–35381, <https://doi.org/10.1074/jbc.M503991200> (2005).
- Hu, W. *et al.* Essential gene identification and drug target prioritization in Aspergillus fumigatus. *PLoS pathogens* **3**, e24, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030024> (2007).

38. Demasi, A. P., Pereira, G. A. & Netto, L. E. Cytosolic thioredoxin peroxidase I is essential for the antioxidant defense of yeast with dysfunctional mitochondria. *FEBS letters* **509**, 430–434 (2001).
39. Lambou, K., Lamarre, C., Beau, R., Dufour, N. & Latge, J. P. Functional analysis of the superoxide dismutase family in *Aspergillus fumigatus*. *Molecular microbiology* **75**, 910–923, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.07024.x> (2010).
40. Paris, S. *et al.* Catalases of *Aspergillus fumigatus*. *Infection and immunity* **71**, 3551–3562 (2003).
41. Grahl, N., Dinamarco, T. M., Willger, S. D., Goldman, G. H. & Cramer, R. A. *Aspergillus fumigatus* mitochondrial electron transport chain mediates oxidative stress homeostasis, hypoxia responses and fungal pathogenesis. *Molecular microbiology* **84**, 383–399, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08034.x> (2012).
42. Joseph-Horne, T., Hollomon, D. W. & Wood, P. M. Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components. *Biochimica et biophysica acta* **1504**, 179–195 (2001).
43. Neubauer, M. *et al.* Mitochondrial dynamics in the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*: therapeutic and evolutionary implications. *Molecular microbiology* **98**, 930–945, <https://doi.org/10.1111/mmi.13167> (2015).
44. Maxwell, D. P., Wang, Y. & McIntosh, L. The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 8271–8276 (1999).
45. Purvis, A. C. Role of the alternative oxidase in limiting superoxide production by plant mitochondria. *Physiologia Plantarum* **100**, 165–170, <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1997.tb03468.x> (1997).
46. Magnani, T. *et al.* Silencing of mitochondrial alternative oxidase gene of *Aspergillus fumigatus* enhances reactive oxygen species production and killing of the fungus by macrophages. *J Bioenerg Biomembr* **40**, 631–636, <https://doi.org/10.1007/s10863-008-9191-5> (2008).
47. Hagiwara, D. *et al.* NikA/TcsC histidine kinase is involved in conidiation, hyphal morphology, and responses to osmotic stress and antifungal chemicals in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS one* **8**, e80881, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080881> (2013).
48. McCormick, A. *et al.* The two-component sensor kinase TcsC and its role in stress resistance of the human-pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. *PLoS one* **7**, e38262, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038262> (2012).
49. Bruder Nascimento, A. C. *et al.* Mitogen activated protein kinases Saka(HOG1) and MpKc collaborate for *Aspergillus fumigatus* virulence. *Molecular microbiology* **100**, 841–859, <https://doi.org/10.1111/mmi.13354> (2016).
50. Kojima, K., Bahn, Y. S. & Heitman, J. Calcineurin, MpK1 and Hog1 MAPK pathways independently control fludioxonil antifungal sensitivity in *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology* **152**, 591–604, <https://doi.org/10.1099/mic.0.28571-0> (2006).
51. Upadhyay, R. *et al.* Sulphiredoxin plays peroxiredoxin-dependent and -independent roles via the HOG signalling pathway in *Cryptococcus neoformans* and contributes to fungal virulence. *Molecular microbiology* **90**, 630–648, <https://doi.org/10.1111/mmi.12388> (2013).
52. Morano, K. A., Grant, C. M. & Moye-Rowley, W. S. The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **190**, 1157–1195, <https://doi.org/10.1534/genetics.111.128033> (2012).
53. Calera, J. A. *et al.* Cloning and disruption of the antigenic catalase gene of *Aspergillus fumigatus*. *Infection and immunity* **65**, 4718–4724 (1997).
54. Santos, C. S. *et al.* Monitoring H₂O₂ inside *Aspergillus fumigatus* with an Integrated Microelectrode: The Role of Peroxiredoxin Protein Prx1. *Anal Chem*, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b04074> (2018).
55. Vodisch, M. *et al.* Two-dimensional proteome reference maps for the human pathogenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Proteomics* **9**, 1407–1415, <https://doi.org/10.1002/pmic.200800394> (2009).
56. Gomes, F. *et al.* Proteolytic cleavage by the inner membrane peptidase (IMP) complex or Oct1 peptidase controls the localization of the yeast peroxiredoxin Prx1 to distinct mitochondrial compartments. *The Journal of biological chemistry* **292**, 17011–17024, <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.788588> (2017).
57. Chae, H. Z., Kim, H. J., Kang, S. W. & Rhee, S. G. Characterization of three isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in the presence of thioredoxin. *Diabetes Res Clin Pract* **45**, 101–112 (1999).
58. Perkins, A., Nelson, K. J., Parsonage, D., Poole, L. B. & Karplus, P. A. Peroxiredoxins: guardians against oxidative stress and modulators of peroxide signaling. *Trends Biochem Sci* **40**, 435–445, <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.05.001> (2015).
59. Vogtle, F. N. *et al.* Global analysis of the mitochondrial N-proteome identifies a processing peptidase critical for protein stability. *Cell* **139**, 428–439, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.07.045> (2009).
60. Mokranjac, D. & Neupert, W. Thirty years of protein translocation into mitochondria: unexpectedly complex and still puzzling. *Biochimica et biophysica acta* **1793**, 33–41, <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.06.021> (2009).
61. Lee, C. M., Sedman, J., Neupert, W. & Stuart, R. A. The DNA helicase, Hm1p, is transported into mitochondria by a C-terminal cleavable targeting signal. *The Journal of biological chemistry* **274**, 20937–20942 (1999).
62. Poyton, R. O., Ball, K. A. & Castello, P. R. Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. *Trends Endocrinol Metab* **20**, 332–340, <https://doi.org/10.1016/j.tem.2009.04.001> (2009).
63. Tahara, E. B., Navarrete, F. D. & Kowaltowski, A. J. Tissue-, substrate-, and site-specific characteristics of mitochondrial reactive oxygen species generation. *Free radical biology & medicine* **46**, 1283–1297, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.02.008> (2009).
64. Akhter, S. *et al.* Role of alternative oxidase gene in pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. *Infection and immunity* **71**, 5794–5802 (2003).
65. Martins, V. P. *et al.* Involvement of an alternative oxidase in oxidative stress and mycelium-to-yeast differentiation in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Eukaryotic cell* **10**, 237–248, <https://doi.org/10.1128/EC.00194-10> (2011).
66. Avila-Adame, C. & Koller, W. Disruption of the alternative oxidase gene in *Magnaporthe grisea* and its impact on host infection. *Mol Plant Microbe Interact* **15**, 493–500, <https://doi.org/10.1094/MPMI.2002.15.5.493> (2002).
67. Rogov, A. G., Sukhanova, E. I., Uralskaya, L. A., Aliverdieva, D. A. & Zvyagilskaya, R. A. Alternative oxidase: distribution, induction, properties, structure, regulation, and functions. *Biochemistry (Mosc)* **79**, 1615–1634, <https://doi.org/10.1134/S0006297914130112> (2014).
68. Delaunay, A., Isnard, A. D. & Toledo, M. B. H₂O₂ sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *EMBO J* **19**, 5157–5166, <https://doi.org/10.1093/emboj/19.19.5157> (2000).
69. Okazaki, S., Naganuma, A. & Kuge, S. Peroxiredoxin-Mediated Redox Regulation of the Nuclear Localization of Yap1, a Transcription Factor in Budding Yeast. *Antioxidants & redox signaling* **7**, 327–334, <https://doi.org/10.1089/ars.2005.7.327> (2005).
70. Kilani, J. & Fillinger, S. Phenylpyrroles: 30 Years, Two Molecules and (Nearly) No Resistance. *Frontiers in microbiology* **7**, 2014, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02014> (2016).
71. Segmuller, N., Ellendorf, U., Tudzynski, B. & Tudzynski, P. BcSAK1, a stress-activated mitogen-activated protein kinase, is involved in vegetative differentiation and pathogenicity in *Botrytis cinerea*. *Eukaryotic cell* **6**, 211–221, <https://doi.org/10.1128/EC.00153-06> (2007).
72. Lin, C. H. & Chung, K. R. Specialized and shared functions of the histidine kinase- and HOG1 MAP kinase-mediated signaling pathways in *Alternaria alternata*, a filamentous fungal pathogen of citrus. *Fungal Genet Biol* **47**, 818–827, <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.06.009> (2010).
73. Van Thuat, N., Schaefer, W. & Bormann, J. The stress-activated protein kinase FgOS-2 is a key regulator in the life cycle of the cereal pathogen *Fusarium graminearum*. *Mol Plant Microbe Interact* **25**, 1142–1156, <https://doi.org/10.1094/MPMI-02-12-0047-R> (2012).
74. Delaunay, A., Pflieger, D., Barrault, M.-B., Vinh, J. & Toledo, M. B. A Thiol Peroxidase Is an H₂O₂ Receptor and Redox-Transducer in Gene Activation. *Cell* **111**, 471–481, [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)01048-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)01048-6) (2002).

75. Leal, S. M. *et al.* Fungal antioxidant pathways promote survival against neutrophils during infection. *The Journal of clinical investigation* **122**, 2482–2498, <https://doi.org/10.1172/JCI63239> (2012).
76. Philippe, B. *et al.* Killing of Aspergillus fumigatus by alveolar macrophages is mediated by reactive oxidant intermediates. *Infection and immunity* **71**, 3034–3042 (2003).
77. Sambrook, J. & Russell, D. W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3rd edn, (CSHL Press, 2001).
78. Oguacu, R., Rettori, D., Munhoz, D. C., Netto, L. E. & Augusto, O. Reactions of yeast thioredoxin peroxidases I and II with hydrogen peroxide and peroxynitrite: rate constants by competitive kinetics. *Free radical biology & medicine* **42**, 326–334, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.10.042> (2007).
79. Kafer, E. Meiotic and mitotic recombination in Aspergillus and its chromosomal aberrations. *Advances in genetics* **19**, 33–131 (1977).
80. Malavazi, I. & Goldman, G. H. Gene disruption in Aspergillus fumigatus using a PCR-based strategy and *in vivo* recombination in yeast. *Methods Mol Biol* **845**, 99–118, https://doi.org/10.1007/978-1-61779-539-8_7 (2012).
81. Maris, A. F., Assumpcao, A. L., Bonatto, D., Brendel, M. & Henriques, J. A. Diauxic shift-induced stress resistance against hydroperoxides in Saccharomyces cerevisiae is not an adaptive stress response and does not depend on functional mitochondria. *Current genetics* **39**, 137–149 (2001).
82. Munhoz, D. C. & Netto, L. E. Cytosolic thioredoxin peroxidase I and II are important defenses of yeast against organic hydroperoxide insult: catalases and peroiredoxins cooperate in the decomposition of H₂O₂ by yeast. *The Journal of biological chemistry* **279**, 35219–35227, <https://doi.org/10.1074/jbc.M313773200> (2004).
83. Rocha, M. C. *et al.* The Aspergillus fumigatus pckA G579R Mutant Is Defective in the Activation of the Cell Wall Integrity Pathway but Is Dispensable for Virulence in a Neutropenic Mouse Infection Model. *PloS one* **10**, e0135195, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135195> (2015).
84. Yamaguchi, H., Uchida, K., Nagino, K. & Matsunaga, T. Usefulness of a colorimetric method for testing antifungal drug susceptibilities of Aspergillus species to voriconazole. *Journal of infection and chemotherapy: official journal of the Japan Society of Chemotherapy* **8**, 374–377, <https://doi.org/10.1007/s10156-002-0201-y> (2002).
85. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(–Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402–408, <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262> (2001).
86. Malavazi, I. *et al.* Phenotypic analysis of genes whose mRNA accumulation is dependent on calcineurin in Aspergillus fumigatus. *Fungal Genet Biol* **46**, 791–802, <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2009.06.009> (2009).
87. Born, V. L. *et al.* The Aspergillus fumigatus sitA Phosphatase Homologue Is Important for Adhesion, Cell Wall Integrity, Biofilm Formation, and Virulence. *Eukaryotic cell* **14**, 728–744, <https://doi.org/10.1128/EC.00008-15> (2015).
88. Marim, F. M., Silveira, T. N., Lima, D. S. Jr & Zamboni, D. S. A method for generation of bone marrow-derived macrophages from cryopreserved mouse bone marrow cells. *PloS one* **5**, e15263, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015263> (2010).
89. Mech, E., Thywissen, A., Guthke, R., Brakhage, A. A. & Figge, M. T. Automated image analysis of the host-pathogen interaction between phagocytes and Aspergillus fumigatus. *PloS one* **6**, e19591, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019591> (2011).
90. Almeida, F. *et al.* Galectin-3 impacts Cryptococcus neoformans infection through direct antifungal effects. *Nat Commun* **8**, 1968, <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02126-7> (2017).

Acknowledgements

We thank Dr. Sergio Akira Uyemura (Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP) and Dr. Taisa Magnani Dinamarco (Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP) for gently providing the anti *A. fumigatus* AoxA antibody. We also thank Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; grants 2009/53546-5; 2015/17541-0 for I.M., 2013/22375-6 for M.C.R., 2014/16636-4 for K.F.G and 2016/03322-7 to F.A.) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; grant 462383/2014-8 for I.M.). The funders had no role in study design, interpretation, or the decision to submit the work for publication. We are grateful to Andreia Cristina dos Santos Lourenço for laboratory technical assistance (FAPESP 2016/14156-0).

Author Contributions

I.M., M.A.O., L.E.S.N., A.F.C., G.H.G. and F.A. designed research; I.M., K.F.G., M.C.R., R.B.F., J.H.T.M.F., M.M.F.B., P.A.C. and F.A. performed research; I.M., M.A.O., L.E.S.N., A.F.C., G.H.G. and F.A. contributed reagents/analytic tools; I.M., M.A.O., L.E.S.N., A.F.C., G.H.G. and F.A. analyzed data; I.M., M.A.O., L.E.S.N. and G.H.G. wrote the paper. I.M. supervised research.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30108-2>.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2018

Monitoring H₂O₂ inside *Aspergillus fumigatus* with an Integrated Microelectrode: The Role of Peroxiredoxin Protein Prx1

Carla Santana Santos,[†] Renata Bannitz-Fernandes,[‡] Alex S. Lima,[†] Carlos A. Tairum,[‡] Iran Malavazi,[§] Luis E. S. Netto,[‡] and Mauro Bertotti*,[†]

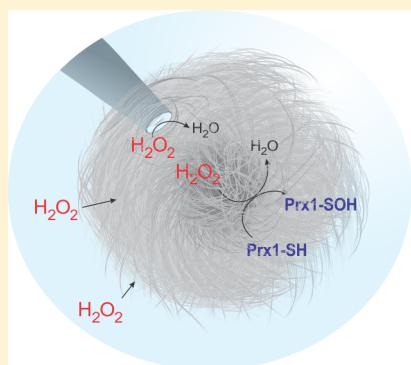
[†]Department of Fundamental Chemistry, Institute of Chemistry, University of São Paulo, Av. Professor Lineu Prestes, 748, 05513-970, São Paulo - SP Brazil

[‡]Department of Genetics and Evolutionary Biology, Institute of Biosciences, University of São Paulo, Rua do Matão, 321, 05508-090, São Paulo - SP Brazil

[§]Department of Genetics and Evolution, Federal University of São Carlos, Rodovia Washington Luís, s/n, 13565-905, São Carlos - SP Brazil

S Supporting Information

ABSTRACT: Peroxiredoxins (Prx) are important proteins involved in hydroperoxide degradation and are related to virulence in several pathogens, including *Aspergillus fumigatus*. In this work, *in vivo* studies on the degradation of hydrogen peroxide (H₂O₂) in the microenvironment of *A. fumigatus* fungus were performed by using an integrated Pt microelectrode. Three *A. fumigatus* strains were used to confirm the role of the cytosolic protein Prx1 in the defense mechanism of this microorganism: a wild-type strain, capable to expressing the protein Prx1; a Δprx strain, whose gene *prx1* was removed; and a genetically complemented $\Delta prx1::prx1^+$ strain generated from the $\Delta prx1$ and in which the gene *prx1* was reintroduced. The fabricated microelectrode was shown to be a reliable inert probe tip for *in situ* and real-time measurements of H₂O₂ in such microenvironments, with potential applications in investigations involving the mechanism of oxidative stress.



Recent advances in transplant medicine have substantially reduced the overall morbimortality associated with these clinical approaches. However, immunosuppressive regimens required for the transplantation procedures are the main cause of the increased incidence of opportunistic infections in this group of immunosuppressed patients worldwide.^{1–3} Among the leading causative agents of these nosocomial infections is the mold *Aspergillus fumigatus*, which causes invasive pulmonary aspergillosis (IA), a life-threatening infection which kills 60–90% of the infected patients with prolonged neutropenia.^{3,4} IA is launched by the inhalation of the highly dispersive and abundant conidia of this fungus that subsequently reach the lungs, germinate and colonize the tissue.^{5,6} Following *A. fumigatus* conidia inhalation, the respiratory immune system coordinates several responses that cause fungal clearing and precludes infection in the immune competent host. These events include killing by oxidative (peroxides, superoxides and hydroxyl radical) and nonoxidative (hydrolases, lipases, and DNases) mechanisms.^{7–10} Specifically, the oxidative response plays a pivotal role in fungal clearance.¹¹ An evidence for that is the strong positive correlation between deficient reactive oxygen species (ROS) production and the high incidence of IA (26–45%) in patients with the genetic disorder called Chronic Granulomatous Disease (CGD), a condition that causes the immune system to malfunction, where innate immune cells cannot elicit the oxidative burst.^{12,13}

To successfully colonize the host, pathogens must nullify the host-driven ROS release.¹⁴ Among the enzymatic detoxifying defenses, peroxiredoxins (Prx) play an important role in hydroperoxide removal¹⁵ and also contribute for the regulation of peroxide levels within cells. Importantly, Prx are involved in virulence in several pathogens,^{14,16–19} including *A. fumigatus*.²⁰ These enzymes are often presented at high levels in different cell types and compartments, where they can rapidly and efficiently reduce hydroperoxides.²¹ Prx are cysteine-based peroxidases that contain one (1-Cys) or two (2-Cys) conserved Cys residues for their activity,²² presenting elevated catalytic rates ranging from 10^6 to $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.^{23–25}

There are still several questions in the understanding on how the fungus decomposes peroxide *in vivo* and how these reactions impact the fungal cell physiology. Direct determination of H₂O₂ levels in the fungus extract is technically complex because this molecule can be oxidized. In addition, information regarding the subcellular localization of the H₂O₂ molecules is lost in cell-free approaches. Besides the spatial-temporal limitations, the H₂O₂ real-time measurements are also a challenge in filamentous fungi cell biology. Currently, most of the available methods for H₂O₂ determinations are indirect and

Received: October 4, 2017

Accepted: January 18, 2018

Published: January 18, 2018

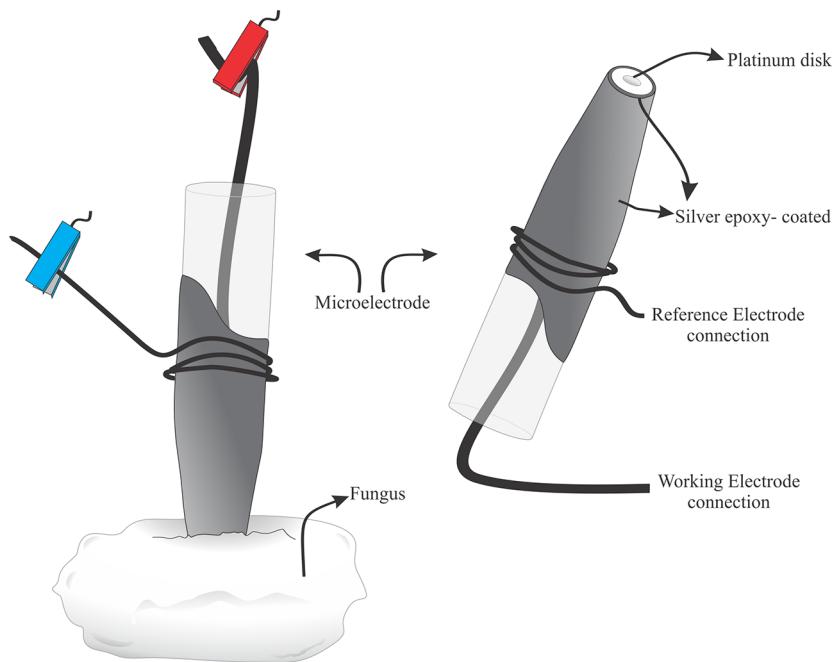


Figure 1. Schematic image of the Pt/AgQRCE integrated microelectrode and its insertion into a fungus (mycelium clumps).

therefore have limited specificity. Determinations based on genetically encoded H_2O_2 probes have also been developed,²⁶ however, limitations associated with this approach include in some cases artifacts due to pH effects within the cells.²⁷ Furthermore, not all organisms are amenable for genetic manipulation.

Electrochemical sensors are generally easy to use, compact and portable, relatively low-cost and have low power requirements. Moreover, there is no need for sample collection, preservation and transportation, as well as laborious pretreatment procedures to make the target compound available for further analysis in remote laboratories. Hence, they are an attractive tool to get fast and real-time information on changes in the concentrations of chemical species. If electrochemical sensors are fabricated in micrometric dimensions, additional advantages are expected as chemical information can be extracted with high spatial resolution. Because mass-transport is very fast and the influence of the capacitive response is reduced for microelectrodes, information can be obtained in microscopic domains with high sensitivity. Indeed, such valuable information can have high impact on the study of *A. fumigatus* biology and in host pathogens interaction.

Accordingly, in this paper we show our efforts to monitor the degradation of H_2O_2 in the important human opportunistic pathogen *A. fumigatus* by using a microelectrode inserted in the mycelium clump environment. To our knowledge, this is the first time a microelectrode was applied as an inert tool to measure degradation of H_2O_2 in fungus. We have decided to analyze the Prx1 participation in H_2O_2 detoxification once this cytosolic protein is important to oxidative defense and it is the major 1-Cys Prx involved in virulence of *A. fumigatus*.²⁸ Therefore, wild-type, Δprx and $\Delta\text{prx1::prx1}^+$ strains were compared according to their capability of detoxifying exogenous H_2O_2 using the proposed methodology.

EXPERIMENTAL SECTION

Chemicals. Reagents were of analytical grade (purity >99%) and used as received. Potassium ferricyanide, potassium

chloride, hydrogen peroxide, and catalase (C-40) were purchased from Sigma-Aldrich. All solutions were prepared using water purified via a Nanopure Infinity system from Barnstead (Dubuque, IA, U.S.A.). Measurements in absence of oxygen were performed in solutions purged with argon (Air Products SA, Brasil).

Fabrication and Characterization of the Pt/AgQRCE Integrated Microelectrode. The platinum microelectrode was fabricated by embedding a 25 μm diameter platinum wire (purity, 99.99%; hard, Goodfellow, U.K.) inside a borosilicate glass capillary tube (L, 150 mm; o.d., 1.0 mm; i.d., 0.58 mm, Sutter Instruments, U.S.A.) and sealing both materials commonly using a P-2000 Micropipette Puller (Sutter Instrument Company, U.S.A.). In order to perform local measurements and facilitate the insertion of the sensor into the fungus, the external body of the microelectrode was coated with a coaxial silver epoxy layer (EPO-TEK, U.S.A.) to get an integrated microelectrode, where the silver coat acted as a quasi reversible counter-reference electrode.²⁹ Nickel chromium wires were used as electrical connectors. The resulting integrated microelectrode was characterized by cyclic voltammetry in a 15 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ solution containing 0.1 M KCl and the radius of the microelectrode was found to be 5 μm by using the equation that gives the limiting current, i_L , at steady state condition ($i_L = 4nFDCr$, where D is the diffusion coefficient, C is the bulk concentration of the electroactive species, r is the radius of the microdisc electrode, n is the number of electrons involved in the electroic reaction, and F is the Faraday constant³⁰). A calibration curve for H_2O_2 was obtained by measuring steady-state current values (at -0.8 V) from cyclic voltammograms recorded in culture medium. Before and after all measurements, voltammograms were recorded in a solution containing $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ and no significance difference in the electrochemical profile was noticed, attesting the stability of the quasi reversible counter-reference electrode.

In Vivo Electrochemical Measurements. All electrochemical experiments were carried out using an Autolab

PGSTAT 128N potentiostat (Ecochemie, Netherlands) in a conventional electrochemical cell using the fabricated integrated microelectrode. The experiments were carried out by inserting the integrated microelectrode in the microenvironment inside the fungus (mycelium clump), which was immersed in 10 mL minimal medium (MM; glucose 1% (w/v), high nitrate salt solution, pH 6.5, trace elements) solution in a 6 cm Petri dish at room temperature. Figure 1 shows a scheme of the arrangement for in vivo measurements of H₂O₂ with the integrated microelectrode. All details on the strains, culture and preparation of *A. fumigatus* are described in the Supporting Information.

Cyclic voltammograms were recorded sequentially every 2 min before and after the insertion of the probe into a fungus immersed in culture medium. Once the microelectrode was inserted, cyclic voltammograms were recorded before and after addition of aliquots (100 or 200 μL) of a 0.1 M H₂O₂ solution into the MM solution (10 mL). Solutions were carefully stirred after H₂O₂ additions using a pipet tip. All the experiments were performed in quadruplicate ($N = 4$) and the representative results are presented.

Analysis of Cell Survival after Oxidative Stress and Microelectrode Insertion. In order to evaluate whether the mycelium clumps survive after experiments performed according to the protocol described in the previous section (treatment with H₂O₂ and insertion of the microelectrode), studies were carried out using two different protocols. An individual mycelium clump was kept in a plate containing MM solution and it was submitted to the protocol previously described. After the assay, the individual mycelium clump was washed by immersion in MM. Four mycelium clumps per each treatment were gently inoculated in solid YG (2% glucose, 1% yeast extract, trace elements) media plates and kept at 37 °C by 48 h, then the plates were photographed and the diameter of the colony was measured by using the software CorelDraw Graphics Suite 7 (Corel Corporation, Canada).

An additional approach was also carried out and it was based on the use of the alamarBlue assay (Thermo Fisher Scientific), which relies on a redox reagent that gives information about the metabolic activity of cells.^{31–35} If the organism is viable, the reagent becomes reduced by the mitochondrial activity and gives a response at 570 nm (pink color); if not, the reagent responds at 600 nm (blue color). Each mycelium clump was inserted in a well of 24 well plates containing 1 mL of 10% alamarBlue in MM and incubated at 37 °C for 24 and 48 h. To compare the viability between each strain with the wild-type (wt), the percent difference in reduction was calculated using the eq 1.

$$\frac{(\epsilon_{\text{OX}})\lambda_{600}A\lambda_{570} - (\epsilon_{\text{OX}})\lambda_{570}A\lambda_{600}}{(\epsilon_{\text{OX}})\lambda_{600}A^0\lambda_{570} - (\epsilon_{\text{OX}})\lambda_{570}A^0\lambda_{600}} \quad (1)$$

where $A\lambda_{570}$ = observed absorbance reading for test well in $\lambda = 570$ nm; $A\lambda_{600}$ = observed absorbance reading for test well in λ_2 ; $A^0\lambda_{570}$ = observed absorbance reading for wt well in 570 nm; $A^0\lambda_{600}$ = observed absorbance reading for wt well in λ_{600} ; $(\epsilon_{\text{OX}})\lambda_{600} = 117216$; $(\epsilon_{\text{OX}})\lambda_{570} = 80586$.

RESULTS AND DISCUSSION

Characterization of the Pt/AgQRCE Integrated Microelectrode and Response to H₂O₂. The electrochemical behavior of the fabricated integrated microelectrode was first assessed in a well-known system, that is, a 15 mM [Fe(CN)₆]^{3–}

+ 0.1 M KCl solution. The recorded cyclic voltammogram and the observed sigmoidal behavior are typical of the one obtained when mass-transport is fast (Figure 2A), hence, there is no

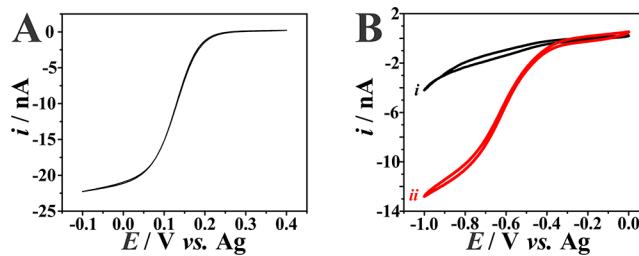


Figure 2. Cyclic voltammograms recorded with the Pt/AgQRCE integrated microelectrode in a 0.1 M KCl + 15 mM [Fe(CN)₆]^{3–} solution (A) and in a deoxygenated 0.1 M KCl solution before (black curve (i)) and after addition of H₂O₂ (1 mM, red curve (ii)) (B). $v: 0.1$ V s⁻¹.

indication of a time-dependent event and a steady-state situation is rapidly achieved. The H₂O₂ response at the fabricated integrated microelectrode was established by recording cyclic voltammograms in supporting electrolyte solution in absence of O₂ (argon was purged into the solution during 10 min to remove dissolved O₂) (Figure 2B, black curve (i)) and presence of 1 mM H₂O₂ only (Figure 2B, red curve (ii)). From these results, one can anticipate that the Pt/AgQRCE integrated microelectrode is a suitable sensor for measuring H₂O₂ at steady-state condition. A calibration plot in the range 1 to 12 mM was obtained by recording cyclic voltammograms upon addition of H₂O₂ to the supporting electrolyte solution (Figure S1).

Study of H₂O₂ Degradation by Prx1 in Aspergillus fumigatus. The integrated microelectrode was attached to a micromanipulator to provide an accurate and slow penetration in the middle of the *A. fumigatus* mycelium clump placed in culture medium (Figure 3A). The recorded cyclic voltammogram in culture medium is shown in Figure 3B (black curve) and the response corresponds to the cathodic reduction of dissolved O₂. Then, the sensor was inserted in the fungus and a new voltammogram was recorded (Figure 3B, red curve). In this case, a significant decrease in the faradaic response was noticed because of the lower concentration of O₂ in this microenvironment. The O₂ levels are lower in biological tissues than in aqueous solutions due to the action of bioenergetics systems such as active mitochondria.³⁶ Hence, the absence of faradaic response due to O₂ electrochemical reduction was used in subsequent experiments to ensure the sensor was inside the fungus.

The Figure 4 shows results on the monitoring of H₂O₂ inside a mycelium clump by measurements of limiting current at –0.8 V from cyclic voltammograms. Before the insertion of the microelectrode in the fungus, the sensor response is due to dissolved O₂ in the MM. With the sensor inside the fungus microenvironment, cyclic voltammograms were recorded before and after repetitive additions of H₂O₂ aliquots to the culture medium. After the first addition, current values remained almost constant (first arrow, 1 mM final concentration), suggesting the H₂O₂ removing enzymes rapidly decomposed this oxidant (Figure 4A). A slight increase was noticed after addition of H₂O₂ to give a final concentration of 1.96 mM (second arrow) (Figure 4A). Reactions catalyzed by peroxiredoxins do not generate O₂, as catalases. Instead,

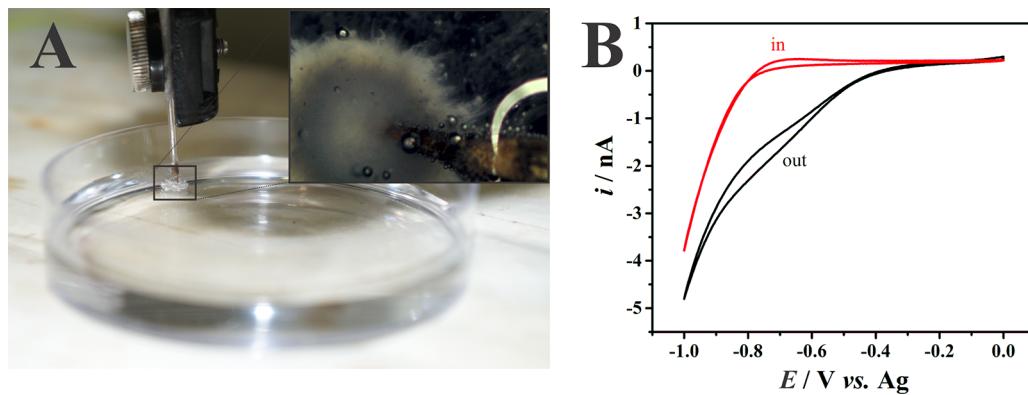


Figure 3. Images of the arrangement for *in vivo* measurements of H_2O_2 in the microenvironment of *A. fumigatus* (A). Cyclic voltammograms recorded with the Pt/AgQRCE integrated microelectrode in a growth medium solution (black curve) and inside the fungus (red curve) (B). $v: 0.1 \text{ V s}^{-1}$.

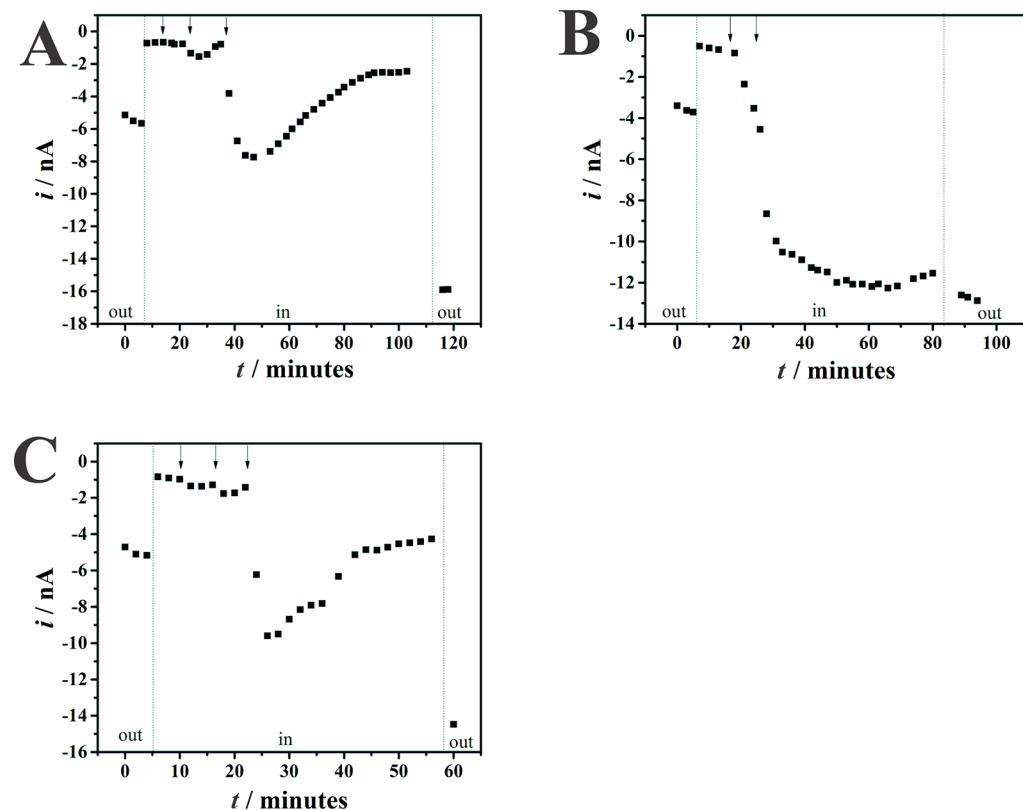


Figure 4. Current values measured at -0.8 V from CVs recorded with a Pt/AgQRCE integrated microelectrode in a culture medium containing *A. fumigatus* wild-type (A), Δprx1 mutant (B) and $\Delta\text{prx1}:\Delta\text{prx1}^+$ complemented strains (C) as a function of time. Arrows indicate the addition of samples of a 100 mM H_2O_2 solution to 10 mL of culture medium to give the following final exogenous H_2O_2 concentrations: 1 (first arrow), 1.96 (second arrow), and 3.85 mM (third arrow).

peroxiredoxins utilize a reactive cysteine to reduce hydroperoxide to its corresponding alcohol or H_2O , in the case of H_2O_2 . The overall reaction³⁷ catalyzed by Prx is



Hence, one can ensure that the current measured with the microelectrode inside the fungus is mainly due to H_2O_2 . Thus, the current increase occurred as a consequence of the transport of exogenous H_2O_2 through the microenvironment of the fungus and the microelectrode surface. A subsequent current decrease was observed and it may be related to a response of H_2O_2 enzymatic and nonenzymatic defense mechanism.³⁸

Then, a new H_2O_2 aliquot was added to the culture medium (third arrow, 3.85 mM final concentration) and a much higher current increase was noticed. In this case, H_2O_2 was provided to the enzymes in a higher level, which was probably not instantly degraded. Moreover, the formation of bubbles at the mycelium was noted, which might be due to H_2O_2 degradation to O_2 by the action of the five catalases present in the genome of *A. fumigatus* (see the bubbles in the inset of Figure 3A). Notwithstanding, after 10 min a new gradual current decrease was observed probably due to H_2O_2 removing enzymes, such as peroxiredoxin Prx1 and catalase.³⁹ In most aerobic cells, there are tens of enzymes capable of removing hydrogen peroxide.

Indeed, both catalase and peroxiredoxins react with hydrogen peroxide at extremely rapid rates (10^6 - 10^7 M $^{-1}$ s $^{-1}$) and cooperate in the protection of microorganisms against this oxidant.⁴⁰ Nevertheless, factors such as compartmentalization, substrate affinity (K_M) and turn over (k_{cat}) may favor a particular enzyme to be the main hydrogen peroxide removal enzyme in a particular condition. Peroxiredoxins besides reacting extremely rapid with H₂O₂, are also highly abundant enzymes and thereby it has been increasingly appreciated that these Cys-based peroxidases are the major H₂O₂ removal enzymes in cells.^{41,42} In the last section of this experiment, the sensor was removed from the fungus microenvironment, remaining in contact with exogenous H₂O₂ present in the culture medium. As expected, current values were higher than those measured inside the fungus microenvironment, where several antioxidant systems for H₂O₂ removal are available. One can also conclude from this experiment that the rate of H₂O₂ decomposition catalyzed by enzymes is quite fast, but the similar natural process (decomposition to water and O₂) is much slower and could not be noticed in the time window of the experiments in this work.

Evidences of the participation of Prx1 in the consumption of H₂O₂ by *A. fumigatus* were confirmed by repeating experiments with a strain in which the *prx1* gene was deleted ($\Delta prx1$). Again, lower current values were obtained from experiments employing the $\Delta prx1$ strain compared to the values recorded in solution. In contrast to the wild-type strain, no decrease in the concentration of H₂O₂ was observed in the $\Delta prx1$ strain (Figure 4B), indicating a major role of Prx1 in the decomposition of this oxidant, at least in the conditions employed herein. From Figure 4B one can notice that a steady current value was recorded a few minutes after the final addition of H₂O₂, indicating the equilibrium between H₂O₂ inside and outside the fungus. As a matter of fact, the current value obtained before removing the sensor from the $\Delta prx1$ strain was just slightly lower than the one recorded outside the mycelium in the end of the experiment. From the calibration plot, maximum H₂O₂ concentration values found in the microenvironments using *prx1* and $\Delta prx1$ strains were 1.7 and 1.6 mM, respectively, and in the end of the experiments such values decreased to 0.44 and 1.5 mM. Taking into account the statistical analysis (two-way ANOVA, $n = 4$), one can roughly conclude the wild-type strain decomposed $71 \pm 7\%$ ($n = 4$) of H₂O₂, whereas this value was much lower and statistically different for the mutant strain, $8 \pm 3\%$ (Figure 5).

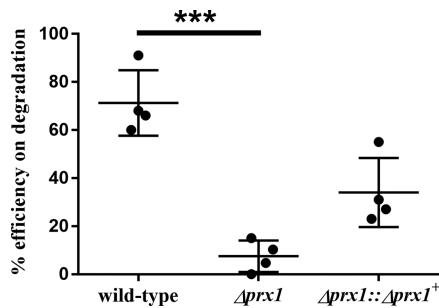


Figure 5. Efficiency of the H₂O₂ degradation in percentage for each strain; $N = 4$. Two-way ANOVA significantly different $p < 0.05$. Dunn's multiple comparisons test: wild-type vs $\Delta prx1$, $p = 0.0051$; wild-type vs $\Delta prx1::\Delta prx1^+$, $p = 0.3502$; $\Delta prx1$ vs $\Delta prx1::\Delta prx1^+$, $p = 0.3502$.

Finally, a control experiment was performed using the $\Delta prx1::\Delta prx1^+$ complemented strain, in which the *prx1* gene was reintroduced as an ectopic transgene. This is important because gene replacement procedures can sometimes generate mutations, besides that targeted to the *prx1* locus. As expected, the results obtained with wild-type and $\Delta prx1::\Delta prx1^+$ strains were highly similar (Figure 4A,C). The complemented strains decomposed $34 \pm 7\%$ of H₂O₂, a higher value than the one corresponding to the mutant strain (8%), further suggesting the relevance of Prx1 in the H₂O₂ decomposition by *A. fumigatus*. Altogether, we can overall speculate that all the other antioxidant systems which include the catalases and the other two *A. fumigatus* peroxiredoxins²⁸ are not sufficient to decompose H₂O₂ to reach wild type levels of this molecule in the genetic background of the $\Delta prx1$ null mutant strain.

Evaluation of *Aspergillus fumigatus* Survival after Oxidative Stress and Microelectrode Insertion. In addition to the oxidative stress effect, the inserted microelectrode might also cause some physical damage to the mycelium clumps, and one can speculate whether such protocol may decrease the viability of the fungi. Hence, additional experiments were performed to examine whether the fungi remained alive after the electrochemical experiments performed according to the proposed protocol.

The mycelium clumps were submitted to the same protocol carried out in the H₂O₂ degradation assay with the microelectrode, followed by inoculation of the individual fungus in plates containing solid medium (YG solution with 2% agar, w/v) to evaluate the fungus viability. The results showed that the mycelium clumps of the three strains (wild type, $\Delta prx1$ and $\Delta prx1::\Delta prx1^+$) developed hyphae and conidia, independently of the contact with H₂O₂ or the microelectrode insertion (Figure S2). Indeed, in all cases the recovered colonies presented similar diameter after 48 h of growing (Table 1).

Table 1. Diameter of the Colony (in cm) after 48 h of Growing at 37 °C in YG Plates after Different Protocols: Insertion of Microelectrode and Exposition of H₂O₂

strains	diameter of the colony (cm)			
	not exposed to H ₂ O ₂		exposed to H ₂ O ₂	
	microelectrode	microelectrode	inserted	not inserted
wild-type	4.2 ± 0.1	4.3 ± 0.3	4.1 ± 0.1	4.1 ± 0.1
$\Delta prx1$	4.3 ± 0.1	4.1 ± 0.1	4.1 ± 0.1	3.9 ± 0.1
$\Delta prx1::\Delta prx1^+$	4.5 ± 0.2	4.3 ± 0.1	4.1 ± 0.1	4.1 ± 0.1

Similar conclusions were achieved by using the alamarBlue assay, according to which the metabolic activity of the fungus can be evaluated by measuring the relative growth calculated from eq 1 (Figure 6). Again, no difference was observed among the three strains in the different experimental conditions, that is, all tests with fungi stuck with the microelectrode and/or exposed to H₂O₂ presented pink color, indicating mitochondrial activity, whereas blue color (no mitochondrial activity) was noticed for the control (without fungus; Figure S3). Curiously, wild-type and $\Delta prx1::\Delta prx1^+$ strains showed the production of conidia (dark dots) (Figure S4) after 48 h of incubation, and this was not observed for the mutant $\Delta prx1$ strain. This may indicate a delay in the conidia development for the mutant strain, which is independent of the microelectrode insertion or oxidative stress.

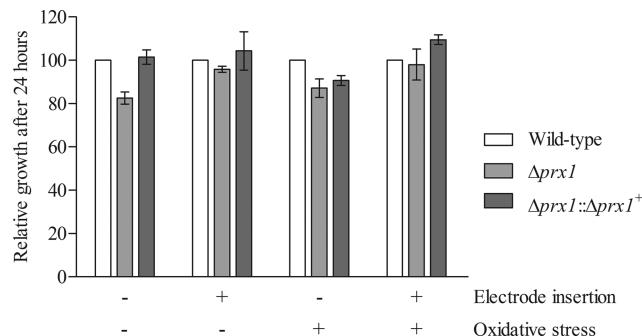


Figure 6. Relative growth after 24 h using the alamarBlue assay. The absorbance was measured at 600 and 570 nm in order to detect metabolic activity. Wild-type strain calculated measurements were considered as 100% growth. No significant differences were found among the groups.

Even though the $\Delta prx1$ mutant showed a lower capacity to detoxify H_2O_2 compared to the wild-type and complemented $\Delta prx1::\Delta prx1^+$ strains (Figure 4), the results of experiments described in this section unequivocally demonstrated the fungus was alive and presented similar growth comparing to the wild-type, even when it was submitted to oxidative stress conditions and after the insertion of the microelectrode. Therefore, current changes noticed for experiments with the $\Delta prx1$ mutant are likely to be a consequence of the absence of the enzyme and not by cell death. Additionally, the inability of the mutant fungus to reduce H_2O_2 highlights the importance of Prx1 in *A. fumigatus* homeostasis. Indeed, the loss-of-function of this peroxiredoxin in *A. fumigatus* leads to attenuated virulence in mice model for invasive pulmonary aspergillosis, further emphasizing the *in vivo* importance of this protein for this opportunistic pathogen.²⁸

CONCLUSIONS

The results shown in this work demonstrate that the fabricated Pt/AgQRCE integrated microelectrode can be used as a sensing system to get fast and *in situ* reliable information on the concentration of H_2O_2 in small biological environments. Here, we unprecedentedly implemented this approach to monitor the H_2O_2 concentration inside of a filamentous fungus (*A. fumigatus* mycelium clumps) after its transfer from a culture medium. Therefore, it was possible to evaluate the H_2O_2 concentration in the surrounding solution, its diffusion through the fungus and subsequent decomposition by a sort of nonenzymatic and enzymatic molecules. Interestingly, a specific antioxidant protein Prx1 from the peroxiredoxin family seems to be essential for H_2O_2 detoxification in *A. fumigatus*, once the mutant strain $\Delta prx1$ is incapable of restoring its basal concentration after exogenous addition. This finding reinforces the advantages of the application of this integrated microelectrode as an inert tool for H_2O_2 measurements in different microenvironments and further evaluation of the role of other proteins and enzymes. It also opens up the possibility of large scale analysis of mutant strains in this important human opportunistic pathogen aiming to understand the basis for H_2O_2 detoxification in filamentous fungus.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: [10.1021/acs.analchem.7b04074](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b04074).

Calibration plot for H_2O_2 obtained with the Pt/AgQRCE integrated microelectrode and information on the strains, culture medium, cultivation of *A. fumigatus*, and results of the evaluation of *A. fumigatus* survival after oxidative stress and microelectrode insertion (PDF).

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail mbertott@iq.usp.br. Phone: 0551130912694.

ORCID

Carla Santana Santos: [0000-0001-6244-3745](https://orcid.org/0000-0001-6244-3745)

Author Contributions

All measurements were conducted by C.S.S. and R.B.-F. with discussion with A.S.L. and C.A.T.J. All authors have written the manuscript. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

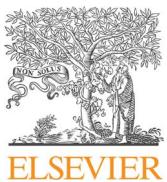
ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Aline S. Barbosa and Thiago G. P. Alegria for the outstanding technical support and the financial support from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), and FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo). Grants #2015/02095-4, #2014/22396-6, #2015/20776-9, and #2013/14955-2 from FAPESP to A.S.L., C.S.S., M.B., and R.B.-F., respectively.

REFERENCES

- (1) Vazquez, J. A.; Miceli, M. H.; Alangaden, G. *Ther. Adv. Infect. Dis.* **2013**, *1*, 85–105.
- (2) Silveira, F. P.; Husain, S. *Med. Mycol.* **2007**, *45*, 305–320.
- (3) Brown, G. D.; Denning, D. W.; Gow, N. A. R.; Levitz, S. M.; Netea, M. G.; White, T. C. *Sci. Transl. Med.* **2012**, *4*, 1–9.
- (4) Brakhage, A. A.; Bruns, S.; Thywissen, A.; Zipfel, P. F.; Behnken, J. *Curr. Opin. Microbiol.* **2010**, *13*, 409–415.
- (5) Lessing, F.; Kniemeyer, O.; Wozniok, I.; Loeffler, J.; Kurzai, O.; Haerl, A.; Brakhage, A. A. *Eukaryotic Cell* **2007**, *6*, 2290–2302.
- (6) Latgé, J.-P. *Clin. Microbiol. Rev.* **1999**, *12*, 310–350.
- (7) Vinh, D. C. *Lancet Infect. Dis.* **2011**, *11*, 780–792.
- (8) Heinekamp, T.; Schmidt, H.; Lapp, K.; Pähtz, V.; Shopova, I.; Köster-Eiserfunke, N.; Krüger, T.; Kniemeyer, O.; Brakhage, A. A. *Semin. Immunopathol.* **2015**, *37*, 141–152.
- (9) Nauseef, W. M. *Immunol. Rev.* **2007**, *219*, 88–102.
- (10) Dambuza, I. M.; Levitz, S. M.; Netea, M. G.; Brown, G. D. *Microbiol. Spectr.* **2017**, *5*, 1–16.
- (11) Chai, L. Y. A.; Netea, M. G.; Vonk, A. G.; Kullberg, B.-J. *Med. Mycol.* **2009**, *47*, 227–236.
- (12) Marciano, B. E.; Spalding, C.; Fitzgerald, A.; Mann, D.; Brown, T.; Osgood, S.; Yockey, L.; Darnell, D. N.; Barnhart, L.; Daub, J.; Boris, L.; Rump, a. P.; Anderson, V. L.; Haney, C.; Kuhns, D. B.; Rosenzweig, S. D.; Kelly, C.; Zelazny, A.; Mason, T.; DeRavin, S. S.; Kang, E.; Gallin, J. I.; Malech, H. L.; Olivier, K. N.; Uzel, G.; Freeman, a. F.; Heller, T.; Zerbe, C. S.; Holland, S. M. *Clin. Infect. Dis.* **2015**, *60*, 1176–1183.
- (13) Segal, B. H.; Romani, L. R. *Med. Mycol.* **2009**, *47*, S282–S2890.

- (14) Mir, A. A.; Park, S.-Y.; Sadat, M. A.; Kim, S.; Choi, J.; Jeon, J.; Lee, Y.-H. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 11831.
- (15) Perkins, A.; Parsonage, D.; Nelson, K. J.; Ogbu, O. M.; Cheong, P. H.-Y.; Poole, L. B.; Karplus, P. A. *Structure* **2016**, *24*, 1668–1678.
- (16) Rouhier, N.; Gelhaye, E.; Gualberto, J. M.; Jordy, M.; Fay, E. De.; Hirasawa, M.; Duplessis, S.; Lemaire, S. D.; Frey, P.; Martin, F.; Manieri, W.; Knaff, D. B.; Jacquot, J. *Plant Physiol.* **2004**, *134*, 1027–1038.
- (17) Dons, L. E.; Mosa, A.; Rottenberg, M. E.; Rosenkrantz, J. T.; Kristensson, K.; Olsen, J. E. *Pathog. Dis.* **2014**, *70*, 70–74.
- (18) Dayer, R.; Fischer, B. B.; Eggen, R. I. L.; Lemaire, S. D. *Genetics* **2008**, *179*, 41–57.
- (19) Kaihami, G. H.; de Almeida, J. R. F.; dos Santos, S. S.; Netto, L. E. S.; de Almeida, S. R.; Baldini, R. L. *PLoS Pathog.* **2014**, *10*, e1004442.
- (20) Hillmann, F.; Bagramyan, K.; Straßburger, M.; Heinekamp, T.; Hong, T. B.; Bzymek, K. P.; Williams, J. C.; Brakhage, A. A.; Kalkum, M. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 33396.
- (21) Perkins, A.; Poole, L. B.; Karplus, P. A. *Biochemistry* **2014**, *53*, 7693–7705.
- (22) Chae, H. Z.; Robison, K.; Poole, L. B.; Church, G.; Storz, G.; Rhee, S. G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, *91*, 7017–7021.
- (23) Tairum, C. A.; Santos, M. C.; Breyer, C. A.; Geyer, R. R.; Nieves, C. J.; Portillo-Ledesma, S.; Ferrer-Sueta, G.; Toledo, J. C.; Toyama, M. H.; Augusto, O.; Netto, L. E. S.; de Oliveira, M. A. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 33133.
- (24) Netto, L. E. S.; Antunes, F. *Mol. Cells* **2016**, *39*, 65–71.
- (25) Flohe, L.; Toppo, S.; Cozza, G.; Ursini, F. *Antioxid. Redox Signaling* **2011**, *15*, 763–780.
- (26) Morgan, B.; Sobotta, M. C.; Dick, T. P. *Free Radical Biol. Med.* **2011**, *51*, 1943–1951.
- (27) Roma, L. P.; Duprez, J.; Takahashi, H. K.; Gilon, P.; Wiederkehr, A.; Jonas, J.-C. *Biochem. J.* **2012**, *441*, 971–978.
- (28) Godoy, K. F.; Rocha, M. C.; Bannitz-Fernandes, R.; Fabri, J. H. T. M.; Barbosa, M. M. F.; de Castro, P. A.; Goldman, G. H.; da Cunha, A. F.; Netto, L. E. S.; de Oliveira, M. A.; Malavazi, I. Unpublished work. Department of Genetics and Evolution, Federal University of São Carlos, Brazil; November 2017; imalavazi@ufscar.br.
- (29) Lima, A. S.; Prieto, K. R.; Santos, C. S.; Paula Valerio, H.; Garcia-Ochoa, E. Y.; Huerta-Robles, A.; Beltran-Garcia, M. J.; Di Mascio, P.; Bertotti, M. *Biosens. Bioelectron.* **2018**, *99*, 108–114.
- (30) Bard, A. J.; Faulkner, L. R. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, 2nd ed.; John Wiley & Sons, 2001.
- (31) Rampersad, S. N. *Sensors* **2012**, *12*, 12347–12360.
- (32) Repp, K. K.; Menor, S. A.; Pettit, R. K. *Med. Mycol.* **2007**, *45*, 603–607.
- (33) Fai, P. B.; Grant, A. *Chemosphere* **2009**, *74*, 1165–1170.
- (34) Meletiadis, J.; Mouton, J. W.; Meis, J. F. G. M.; Bouman, B. A.; Verweij, P. E.; Roilides, E.; Maglaveras, N.; Abrahamsen, T.; Gaustad, P.; Denning, D. W.; Rodriguez-Tudela, J. L.; Petrikos, G. *J. Clin. Microbiol.* **2002**, *40*, 2876–2885.
- (35) Yamaguchi, H.; Uchida, K.; Nagino, K.; Matsunaga, T. *J. Infect. Chemother.* **2002**, *8*, 374–377.
- (36) Solaini, G.; Baracca, A.; Lenaz, G.; Sgarbi, G. *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* **2010**, *1797*, 1171–1177.
- (37) Netto, L. E. S.; Chae, H. Z.; Kang, S. W.; Rhee, S. G.; Stadtman, E. R. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 15315–15321.
- (38) Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 5th ed.; Clarendon Press, 2015.
- (39) Fréalle, E.; Aliouat-Denis, C. M.; Delhaes, L.; Hot, D.; Dei-Cas, E. *Curr. Pharm. Des.* **2013**, *19*, 3713–3737.
- (40) Mishra, S.; Imlay, J. *Arch. Biochem. Biophys.* **2012**, *525*, 145–160.
- (41) Winterbourn, C. C.; Hampton, M. B. *Free Radical Biol. Med.* **2008**, *45*, 549–561.
- (42) Dagnell, M.; Pace, P. E.; Cheng, Q.; Frijhoff, J.; Östman, A.; Arnér, E. S. J.; Hampton, M. B.; Winterbourn, C. C. *J. Biol. Chem.* **2017**, *292*, 14371–14380.



Research Paper

Functional and evolutionary characterization of Ohr proteins in eukaryotes reveals many active homologs among pathogenic fungi



D.A. Meireles^{a,*}, R.M. Domingos^a, J.W. Gaiarsa^a, E.G. Ragnoni^a, R. Bannitz-Fernandes^a, J.F. da Silva Neto^b, R.F. de Souza^c, L.E.S. Netto^{a,*}

^a Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

^b Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

^c Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Ohr/OsmC

Thiol-dependent peroxidases

Phylogeny

ABSTRACT

Ohr and OsmC proteins comprise two subfamilies within a large group of proteins that display Cys-based, thiol dependent peroxidase activity. These proteins were previously thought to be restricted to prokaryotes, but we show here, using iterated sequence searches, that Ohr/OsmC homologs are also present in 217 species of eukaryotes with a massive presence in Fungi (186 species). Many of these eukaryotic Ohr proteins possess an N-terminal extension that is predicted to target them to mitochondria. We obtained recombinant proteins for four eukaryotic members of the Ohr/OsmC family and three of them displayed lipoyl peroxidase activity. Further functional and biochemical characterization of the Ohr homolog from the ascomycete fungus *Mycosphaerella fijiensis* Mf_1 (MfOhr), the causative agent of Black Sigatoka disease in banana plants, was pursued. Similarly to what has been observed for the bacterial proteins, we found that: (i) the peroxidase activity of MfOhr was supported by DTT or dihydrolipoamide (dithiols), but not by β-mercaptoethanol or GSH (monothiols), even in large excess; (ii) MfOhr displayed preference for organic hydroperoxides (CuOOH and tBOOH) over hydrogen peroxide; (iii) MfOhr presented extraordinary reactivity towards linoleic acid hydroperoxides ($k = 3.18 (\pm 2.13) \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Both Cys⁸⁷ and Cys¹⁵⁴ were essential to the peroxidase activity, since single mutants for each Cys residue presented no activity and no formation of intramolecular disulfide bond upon treatment with hydroperoxides. The pK_a value of the Cys_p residue was determined as 5.7 ± 0.1 by a monobromobimane alkylation method. Therefore, eukaryotic Ohr peroxidases share several biochemical features with prokaryotic orthologues and are preferentially located in mitochondria.

1. Introduction

Organic hydroperoxide resistance (Ohr) proteins are Cys-based, thiol dependent peroxidases that belong to a family of proteins called Ohr/OsmC. OsmC (Osmotically inducible protein) are structurally related to Ohr enzymes [1] and together define two subfamilies that have their peroxidase activities well characterized within Ohr/OsmC family [2–4]. Members of a third group remain poorly characterized [1].

The physiological role played by Ohr and OsmC has been linked to the defense against organic hydroperoxide insults [1,5–11]. Ohr and OsmC are structurally distinct from peroxiredoxin (Prx) and glutathione-peroxidase (Gpx) enzymes [1,2], although all are Cys-based, thiol dependent peroxidases. While Prx and Gpx enzymes are ubiquitously distributed in all domains of life, Ohr/OsmC proteins were thought to be present only in Archaea and Eubacteria [2,6]. Contrary to

Ohr enzymes, most Prx enzymes are highly reactive towards H₂O₂. One exception is Tpx from *E. coli* that similarly to Ohr enzymes also display higher specificity to organic peroxides over H₂O₂ [12], although the large majority of these peroxiredoxins are found in bacteria [13].

The catalytic mechanism of hydroperoxide reduction by Ohr and OsmC proteins is centered on a pair of redox-active cysteines, named peroxidatic (C_p) and resolving (C_r) cysteines, resembling that of the atypical 2-Cys Prxs. Ohr and OsmC are functionally dimeric and the cysteine residues are positioned in each monomer as part of two identical active sites located at opposing sides [2]. Two other residues of the active site also participate in catalysis: an arginine (Arg) and a glutamic acid (Glu) [3,14]. The peroxidase cycle starts with the nucleophilic attack of Cys_p towards the hydroperoxide. Upon hydroperoxide reduction to its corresponding alcohol, the C_p is oxidized to the sulfenic acid (Cys-SOH) intermediate, which readily reacts with C_r, giving rise to an intramolecular disulfide bond [14]. A new cycle begins

* Corresponding authors.

E-mail addresses: meireles@ib.usp.br (D.A. Meireles), nettoles@ib.usp.br (L.E.S. Netto).

when the disulfide bond is reduced back to the dithiolic form. Lipoyl groups covalently attached to some proteins are the biological reductants of these intramolecular disulfides [4]. Recently, we demonstrated that Ohr enzymes display high specificity for fatty acid hydroperoxides and peroxynitrite as oxidizing substrates [11].

Here, based on an in-depth sequence analysis, we describe the occurrence and distribution of Ohr and OsmC peroxidases in the Eukarya domain. OsmC proteins were only found in Dictyostelia, whereas Ohr members are predominantly present in Fungi (mainly Ascomycota and Basidiomycota). Four recombinant eukaryotic proteins from the Ohr/OsmC family were purified, three of which displayed thiol peroxidase activity. One of these, namely Ohr from the ascomycota fungus *Mycosphaerella fijiensis* Mf_1 (MfOhr), was further characterized, and its presence in the mitochondria of this fungus was demonstrated.

2. Material and methods

2.1. Dataset source and sequence extraction

The amino acid sequence from *Xylella fastidiosa* 9a5c strain was used as query for search against NCBI nr sequence database using delta-BLAST via NCBI website [15] (June of 2016) and the profile Hidden Markov Model (HMM) iterative method implemented in Jackhmmer 1.9 web server [16]. We conducted the search against NCBI nr sequence database using default options until convergence. The searches were restricted to the Eukarya Domain. Redundant entries and truncated sequences (less than 100 amino acids) were removed using CD-HIT software [17].

2.2. Primary sequence clustering

We identified members of the Ohr and OsmC subfamilies in Eukarya using sequence motifs previously described [1,6]. Additional motifs were detected using alignments of eukaryotic Ohr sequences with structurally solved Ohr (PDB: 1ZB8, from *X. fastidiosa*; 1USP, from *Deinococcus radiodurans*; 3LUS, from *Vibrio cholerae*; 1N2F, from *Pseudomonas aeruginosa*) or OsmC (1NYE, from *Escherichia coli*) proteins. We curated the alignments manually, guided by successive multiple alignments runs generated by MAFFT operating with default sets [18]. The input sequences were collected by delta-blast and jackhmmer searches described in the previous section.

2.3. Phylogenetic analysis

Maximum Likelihood (ML) inference of phylogenetic trees was based on the manually curated MAFFT alignment and the RAxML software [19] and applied to all non-redundant sequences retrieved or only sequences from the Ohr subfamily. For inference, we used Whelan-Goldman (WAG) model of amino acid evolution with rate heterogeneity modeled by a GAMMA distribution and 1000 rapid bootstrap resampled estimates of log-likelihood (RELL bootstrap). The resulting phylogeny was prepared for visualization using Tree Editor from the MEGA 7 software [20].

2.4. Strains and growth conditions

E. coli strains were grown in Lysogenic Broth (LB) medium at 37 °C supplemented with ampicillin (100 µg/mL). *Mycosphaerella fijiensis* Mf_1 was grown in Potato Dextrose Medium (PDB) at room temperature supplemented with streptomycin (100 µg/mL) and chloramphenicol (100 µg/mL). *Dictyostelium discoideum* AX4 cells were grown axenically in liquid maltose HL-5 modified medium [21] supplemented with ampicillin (100 µg/mL) and streptomycin (300 µg/mL) at 22 °C.

2.5. Cloning procedures

To amplify *ohr* (MYCFIDRAFT_54770) and *osmC* (DDB_G0268884) genes without introns, samples of total RNA from germinated conidia of *M. fijiensis* Mf-1 and *D. discoideum* AX4 cells, respectively, were extracted using Trizol reagent (Ambion). RNA samples were treated with RNase-Free DNase I (Ambion) and submitted to reverse transcription (SuperScript II) using Oligo-dT to produce cDNA. To clone *Mfohr* into pET15b (Novagen®) and *DdosmC* into pPROEX expression vectors, sequences were amplified from appropriated cDNAs by PCR using the oligo pairs (5'→3'): Fow_TTAGCATATGGCTCCGTAAGAGCATTC/Rev_TTAGGGATCCCGTCCGCTCTATCCAATAA and Fow_AGTATATGAGCATTAGTAATAAAATTATTGGATCAGC/Rev_AGTGGATCCAAAAACAAATGGTGAGAAATCTG, respectively. The restriction sites for *Nde*I and *Bam*HII are depicted by bold letters. Additionally, for *Mfohr* gene, a second PCR was performed using the same conditions described above using forward oligo (5'→3') TTAGCATATGTCCCCGCCATTCTAC ACAGCCCCAT, to produce a version of the protein MfOhr without the first 33 amino acid residues (MfOhr_{del}). The *ohr* gene from *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foohr*) and Ohr-like (named as *osmC* gene by [22]) from *Trichomonas vaginalis* (*TvosmC*) were commercially synthesized by GenScript USA Inc., containing the sites for *Nhe*I and *Bam*HII restriction enzymes in the flanking regions. The fragments that corresponded to the *Foohr* and *TvosmC* genes were digested from pUC57 using *Nde*I and *Bam*HII restriction enzymes and subcloned into pET15b. Fidelity of all sequences was checked by chain termination sequencing method using T7 promoter and terminator oligonucleotides.

2.6. Protein purification

Expression of recombinant MfOhr, MfOhr_{del}, FoOhr, DdOsmC or TvOsmC was induced by 0.1 mM of isopropyl 1-thio-β-D-galactopyranoside (IPTG) for 16 h at 20 °C in exponential culture (OD₆₀₀ 0.5) of *E. coli* BL21 (DE3) CodonPlus (Agilent) harboring the appropriate expression vectors with moderate shaking. Then, cells were harvested by centrifugation and resuspended in the lysis buffer (500 mM NaCl, 20 mM sodium phosphate pH 7.4, 0.2 mg/mL lysozyme, 1 mM PMSF and 20 mM imidazole). Cells were disrupted by sonication (ten alternating cycles of 15 s of sonication 30% amplitude and 1 min on ice bath). Cell debris were separated from the supernatant by centrifugation at 15,000 rpm at 4 °C during 40 min. The supernatant was filtered using a 0.45 µm pore membrane and all expressed proteins were affinity purified (Ni-NTA Agarose column, Qiagen) with a peristaltic pump. The charged resin was washed sequentially with 3 column volumes of washing buffer (500 mM NaCl, 20 mM sodium phosphate pH 7.4) containing 50 mM and 100 mM imidazole and eluted with 3 column volumes of elution buffer (500 mM NaCl, 20 mM sodium phosphate pH 7.4 and 500 mM imidazole). Buffer exchange and concentration of purified proteins were performed in an Amicon Centrifugal 10 MW device (Millipore®). Protein purity was checked by SDS-PAGE and protein concentration was spectrophotometrically determined by its absorbance at 280 nm (for MfOhr, ε_{ox} = 9970 and ε_{red} = 10,095; for MfOhr_{del}, ε_{ox} = 4595 and ε_{red} = 4470 M⁻¹ cm⁻¹; for FoOhr, ε_{ox} = 11,585 and ε_{red} = 11,460 M⁻¹ cm⁻¹, for DdOsmC, ε_{ox} = 10,220 and ε_{red} = 9970 and for TvOsmC, ε_{ox} = 15,720 and ε_{red} = 15,470, according to ProtParam tool [23]).

2.7. Reduction of peroxidases with DTT

In some assays, Cys-based peroxidases (MfOhr_{del} or AhpE) were pre-reduced by 50 mM of DTT for 16 h at 4 °C, in the presence of 500 mM NaCl and 20 mM sodium phosphate pH 7.4. Excess of DTT was eliminated by two rounds of size-exclusion chromatography (HiTrap DessaLting, GE HealthCare) in a buffer (500 mM NaCl and 20 mM sodium phosphate pH 7.4) previously purged with N₂. The efficiency of this procedure was ascertained by the DTNB method [24].

2.8. Thiol dependent peroxidase activity assays

Reductions of cumene hydroperoxide (CuOOH), *tert*-butyl hydroperoxide (tBOOH) or hydrogen peroxide (H_2O_2) were monitored by FOX assay [25] using DTT, dihydrolipoamide (DHLA), β -mercaptoethanol or glutathione as reductants.

Peroxidase activities were also analyzed by the lipoamide/lipoamide dehydrogenase coupled assay, following absorbance decay at 340 nm, as a consequence of NADH oxidation [4,26,27]. In this assay, the reaction was carried out at distinct concentrations of Ohr or OsmC enzymes as indicated in the legend of Fig. 4.

2.9. Site directed mutagenesis

The oligo pairs (5'→3') used to mutated C_p to serine (C87S) were C87SF TACGGAGCTTCCCTCCAAG and C87SR CTTGGAAGGAAGCTCCGT and C_r to serine (C154S) were C154SF AAGGAGGTCAGTCCGTATAGC and C154SR GCTATACGGACTGACCTCCTT, using the QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies). The bold letters indicate the mutate nucleotide(s).

2.10. Kinetics of linoleic acid hydroperoxide (LAOOH) reduction by MfOhr_{del} - AhpE competition assay

The rate constant for the reduction of LAOOH by MfOhr was calculated according to a competitive assay previously described [11] that takes advantage of the redox-dependent changes in the intrinsic fluorescence of AhpE, a Cys-based peroxidase from *Mycobacterium tuberculosis* (MtAhpE) [6]. Briefly, Ohr and AhpE were pre-reduced with 50 mM of DTT as described above. Stopped-flow fluorescence measurements were performed using a commercially available stopped-flow device (SFA-20 Rapid Kinetics Spectrometer Accessory, TgK Scientific, United Kingdom, UK) coupled to a Varian Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer (Agilent Technologies).

2.11. pK_a determination of C_p residue from MfOhr_{del} WT

The pK_a of the thiolate in C_p from MfOhr_{del} was determined using the monobromobimane (mBrB) alkylation method that generates a fluorescent product detected at λ_{exc} 396 nm and λ_{em} 482 nm [29]. MfOhr_{del} was pre-reduced by DTT as described above. The assays were performed in flat-bottom white polystyrene 96-well plates (Costar) in triplicates, using Varian Cary Eclipse fluorescence spectrophotometer, operating at medium voltage with both emission and excitation slit of 5 nm. Immediately after the end of the reaction, the pH of samples was checked. An additional blank reaction was performed in absence of thiols, to determine if other components in buffers might interfere with the reaction.

The angular coefficients were calculated using time points that included at least the initial 10 min of reaction that were fitted in a straight line. The curves displayed in Fig. 9 were obtained by non-linear regression using Henderson-Hasselbalch equation and considering 95% of confidence using Prism 4 for Windows, GraphPad Software, San Diego, CA.

2.12. Affinity purification of *X. fastidiosa* anti-Ohr serum

Since Ohr proteins present high structural similarity among themselves, we purified serum antibodies raised against Ohr from *X. fastidiosa* [4] to increase their specificity towards eukaryotic Ohr. Firstly, the His-tag from recombinant MfOhr was digested with thrombin following manufacturer instructions (Thrombin CleanCleave™ Kit, SIGMA Aldrich). The cleaved protein was covalently attached to a CNBr sepharose resin and stored in PBS pH 8.0. Then, the MfOhr sepharose beads were incubated with 2 mL of serum anti-XfOhr diluted in 8 mL of PBS pH 8.0 during 2 h at 4 °C. After, the beads were

extensively washed with PBS pH 8.0 and antibodies were eluted from the resin with 2 mL of 0.2 M glycine pH 2.8. The samples eluted (500 μ L fractions) were immediately neutralized with 20 μ L of 3 M Tris-HCl pH 8.8 and 100 μ L of 3 M KCl.

2.13. Protoplastization of *M. fijiensis* mycelia

Approximately 10^6 conidia \times mL⁻¹ of *M. fijiensis* Mf_1 were inoculated in 100 mL of PDB medium supplemented with 34 μ g/mL of chloramphenicol and incubated during 36 h at 30 °C under agitation (200 rpm). Cell walls of mycelia were digested with a mix of enzymes Lallzyme MMX (15g/L), lysing enzymes from *Trichoderma harzianum* (5g/L) (Sigma-Aldrich cat # L1412) and BSA (10g/L) in the presence of 50 mL of solution 1 (0.8 M ammonium sulfate, 0.1 M citric acid, pH 6), 50 mL of solution 2 (1% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) sucrose, pH 6) and 26 mL of 1 M MgSO₄ and incubated during 5 h at 30 °C under gently agitation (100 rpm). Digested mycelia were filtered through a glass wool in order to separate protoplasts from cell debris and centrifuged 4000 rpm during 10 min at 4 °C.

2.14. Subcellular fractionation

The subcellular fractionation was adapted from [30]. Briefly, To isolate mitochondria, protoplasts were suspended in 10 mL of SHE buffer (0.6 M sorbitol, 20 mM HEPES and 1 mM EDTA) supplemented with 1 mM PMSF and mechanical disrupted after 50 strokes on ice using a *dounce homogenizer*. The lysed protoplasts solution, that represented the total fraction (TF), was centrifuged at 3800 rpm for 7 min at 4 °C and the supernatant was reserved. The same procedure was repeated three times to wash away all cellular debris and some organelles like nuclei and the supernatant collected was submitted to a final centrifugation step at 16,000xg during 10 min at 4 °C to separate supernatant (cytoplasmic fraction, CF) from pellet (enriched mitochondrial fraction). The enriched mitochondrial fraction (EMF) was suspended in 200 μ L of SHE buffer and all collected fractions were stored at –80 °C.

2.15. MfOhr subcellular localization

To determine the subcellular localization of MfOhr, 15 or 30 μ g of protein from extracts that correspond to the total fraction (TF), cytoplasmic fraction (CF) and enriched mitochondrial fraction (EMF) were separated by SDS-PAGE and the proteins were transferred to a nitrocellulose membrane. The membrane was stained with Ponceau S to check the amount of loaded proteins and incubated with antibodies that specifically target proteins from the cytoplasm (anti-PGK-1, phosphoglycerate kinase 1, Nordic BioSite cat. number BT-BS6691) or mitochondria (anti-COX IV, cytochrome c oxidase subunit IV, Abcam ab14744).

3. Results

3.1. Ohr/OsmC homologs data mining and their taxonomic distribution among eukaryotes

Previously, Ohr and OsmC enzymes were thought to be present only in bacteria [2,6]. Our searches for homologs using delta-BLAST [15] and jackhmmer [16] in NCBI nr database revealed the existence of 392 eukaryotic proteins belonging to the Ohr/OsmC family (Table S1). Successive alignments of all of these eukaryotic sequences allowed us to ascertain that 189 of these sequences belong to Ohr subfamily and 5 sequences belong to the OsmC subfamily. We also identified a third group of Ohr/OsmC sequences, named here as Ohr-like, that comprise 198 proteins from eukaryotic organisms (Table S1) and that await further characterization.

Ohr, OsmC and Ohr-like proteins share a conserved pair of catalytic cysteines separated by approximately 60 amino acid residues in the

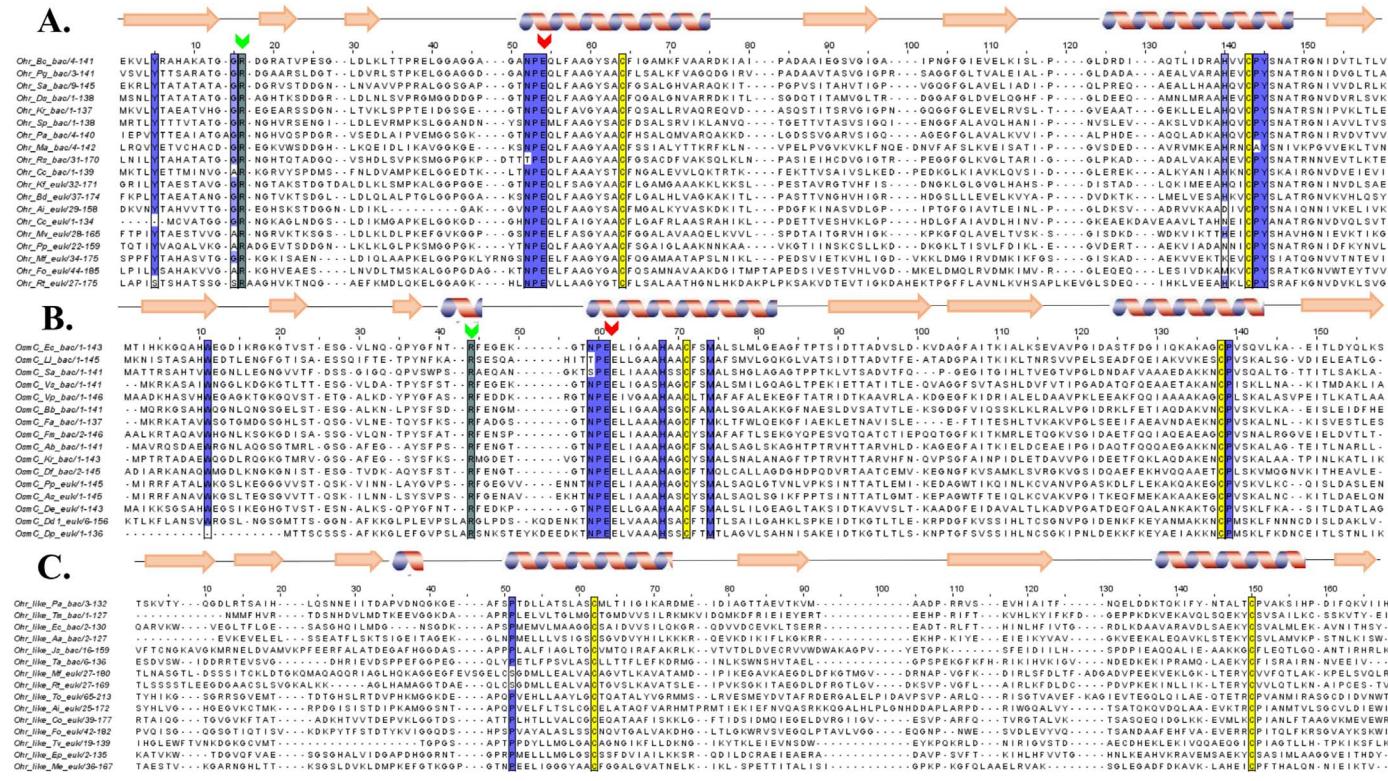


Fig. 1. Multiple sequence alignment of selected members from Ohr, OsmC and Ohr-like subfamilies. The sequences were aligned using t-INS-I algorithm of MAFFT [13]. For each subfamily, sequences from different bacteria phyla were aligned with selected Ohr eukaryotic sequences. (A) For Ohr, 4NOZ secondary structure from *Burkholderia cenocepacia* J2315 (Bc_Ohr) was used to guide the alignment. Green and red arrows denote catalytic Arg and Glu. The selected Ohr sequences of prokaryotes were: Rs_Ohr from *Ralstonia solanacearum* UW551, Sa_Ohr from *Stigmatella aurantiaca*, Pg_Ohr from *Polymorphum gilvum*, Pa_Ohr from *Propionibacterium acnes*, Cc_Ohr from *Clostridium carboxidivorans*, Sp_Ohr from *Sphingobacterium paucimobilis*, Ds_Ohr from *Deinococcus swensis*, Mr_Ohr from *Mastigocladopsis repens*, Kr_Ohr from *Ktedonobacter racemifer* and Ma_Ohr from *Mycoplasma aligatoris*. The selected Ohr sequences of eukaryotes were: Pp_Ohr from *Physcomitrella patens*, Kf_Ohr from *Klebsormidium flaccidum*, Mf_Ohr from *Mycosphaerella fijiensis* CIRAD86, Pm_Ohr from *Pseudocercospora musae*, Fo_Ohr from *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4, Ai_Ohr from *Aphanomyces invadans*, Bd_Ohr from *Brachochytrium dendrobatidis* JEL423, Cc_Ohr from *Calocera cornea* HHB12733 Cc_1, Rt_Ohr from *Rhodotorula toruloides* ATCC 20409, Me_Ohr from *Mortierella elongata* AG-77, Mv_Ohr from *Mortierella verticillata* NRRL 6337. (B) For OsmC, 1QLM secondary structure from *Escherichia coli* (Ec_OsmC) was used to guide the alignment. Green and red arrows denote catalytic Arg and Glu. The selected OsmC sequences of prokaryotes were: Vp_OsmC from *Variovorax paradoxus*, Ab_OsmC from *Azospirillum brasilense*, Bb_OsmC from *Bdellovibrio bacteriovorus*, Sa_OsmC from *Streptomyces avermitilis*, Fa_OsmC from *Flavobacterium aquatile*, Kr_OsmC from *Ktedonobacter racemifer*, Df_OsmC from *Deinococcus frigens*, Ll_OsmC from *Lactococcus lactis*, Fm_OsmC from *Fischerella muscicola* and Vs_OsmC from *Verrucomicromyces spinosum*. The selected OsmC sequences of eukaryotes were: Pp_OsmC from *Polysphondylium pallidum* PN500, Dp_OsmC from *Dictyostelium purpureum*, As_OsmC from *Acystostelium subglobosum* LB1 and Dd1_OsmC from *Dictyostelium discoideum*. (C) Selected Ohr-like sequences deposited in PDB database were aligned with selected Ohr-like members from eukaryotic counterparts. For Ohr-like, secondary structure 2PN2 from *Psychrobacter arcticus* 273-4 (Pa_Ohr_like) was used to guide the alignment. The selected OsmC sequences of prokaryotes were: Aa_Ohr_like from *Aquifex aeolicus*, Js_Ohr_like from *Jannaschia* sp., Ll_Ohr_like from *Lactobacillus casei*, Tm_Ohr_like from *Thermotoga maritima*, Ta_Ohr_like from *Thermoplasma acidophilum*. The selected Ohr-like sequences of eukaryotes were: Mp_Ohr_like from *Micromonas pusilla* CCMP1545, Ep_Ohr_like from *Exaiphtasia pallida*, Tv_Ohr_like from *Trichomonas vaginalis* G3, To_Ohr_like from *Thalassiosira oceanica*, Ai_Ohr_like from *Aphanomyces invadans*, Mf_Ohr_like from *Mycosphaerella fijiensis* CIRAD86, Fo_Ohr_like from *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4, Cc_Ohr_like from *Calocera cornea* HHB12733, Rt_Ohr_like from *Rhodotorula toruloides* ATCC 204091 and Co_Ohr_like from *Capsaspora owczarzaki* ATCC 30864. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

primary sequence (Fig. 1) that, therefore, represents a hallmark feature of Ohr/OsmC family proteins. Two additional residues (an Arg and a Glu) required for the peroxidatic activity [2,4,6,14] are both fully conserved in Ohr and OsmC subfamilies (Fig. 1A and B) but are absent in Ohr-like proteins (Fig. 1C). This conserved Glu residue is located at the same position in the primary sequences of Ohr and OsmC proteins, while the conserved Arg residue is located in the first loop between the 1st and 2nd β -sheets for Ohr proteins (Fig. 1A); and in the third loop between the 3rd β -sheet and the 1st α -helix for OsmC (Fig. 1B). Although the conserved Arg residue is present at different positions in the primary sequences of Ohr and OsmC enzymes, in the tertiary structures they occupy a similar orientation between the conserved Glu and C_p [1,12].

Members of Ohr/OsmC family were detected in all eukaryotic groups, except Metazoa (Fig. 2A), considering the Tree of Life and taxonomy proposed by [31]. The largest number of Ohr/OsmC homologs was observed in Fungi (76% or 300/392 of sequences), mainly in the Ascomycota and Basidiomycotae phyla. Other microbial eukaryotes from a wide range of clades contain about 16% (63/392 of sequences) of Ohr/OsmC homologs, such as Euglenozoa; Amebozoa;

Metamictina (*Trichomonas vaginalis*); Heterolobosea (*Naeleglia gruberi* strain NEG-M); and non-metazoan Holozoa, such as Choanoflagellida (*Salpingoeca*, *Monosiga*), Ichthyosporea (*Sphaeroforma*) and Filasterea (*Capsaspora*). Close to 5% (20/392) of all Ohr/OsmC sequences were found in the SAR (Stramenopiles, Alveolata and Rhizaria) clade, such as Alveolata (*Tetrahymena*, *Ichthyophthirius* and *Vitrella brassicaformis* C-CMP3155), Stramenopiles (*Aphanomyces*, *Saprolegnia*, *Thalassiosira* and *Nannochloropsis*) and Rhizaria (*Reticulomyxa filosa*) groups. Among the photosynthetic eukaryotes, Cryptista (*Guillardia theta* CCMP2712), Haptophyceae (*Emiliania huxleyi* CCMP1516), and non-vascular plants encode homologs of Ohr/OsmC genes in their genomes. Genes from non-vascular plants correspond to almost 2% of Ohr/OsmC homologs and were detected in the Chlorophyta (*Chlorella* and *Micromonas*), Bryophyta (*Physcomitrella patens*), Marchantiophyta (*Marchantia polymorpha*) and Streptophyta (*Klebsormidium flaccidum*).

We also retrieved sequences from Metazoa, including sequences from nematode, *Trichuris trichiura* (GenBank accession CDW57322.1 and described in [22] as a member of Ohr/OsmC family), insect, *Drosophila eugracilis* (XP_017066882), crustacean, *Daphnia magna* (KZS01297) and sea anemone *Exaiphtasia pallida* (KXJ04390). However,

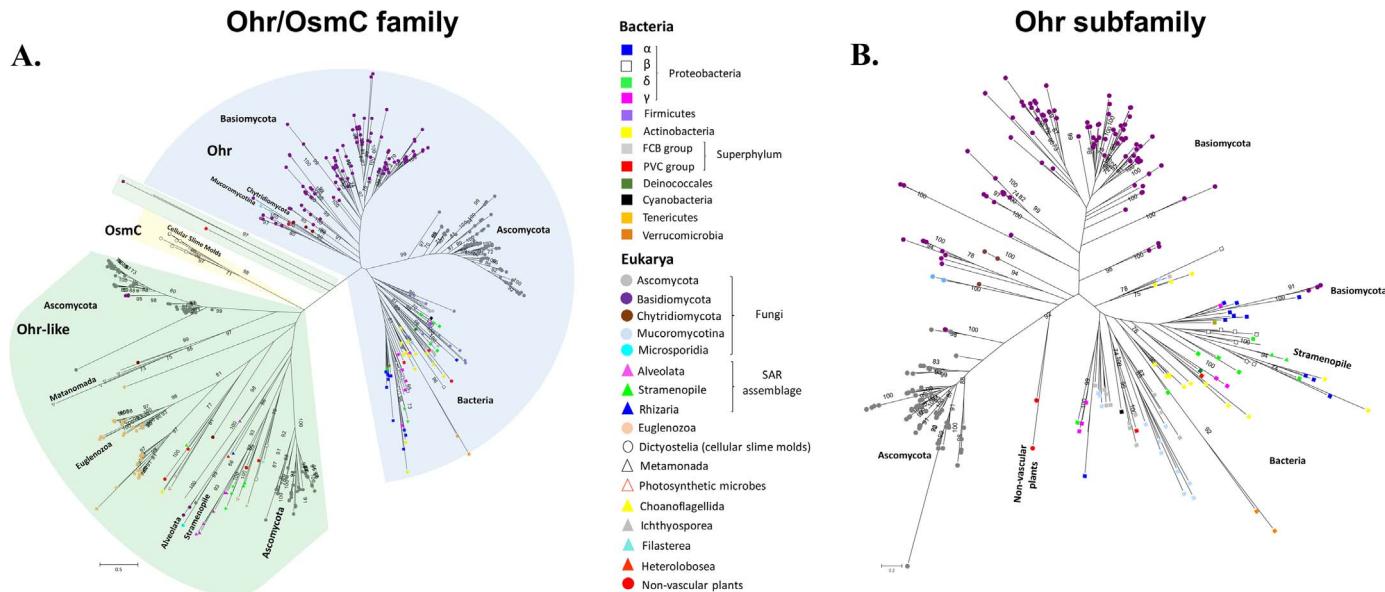


Fig. 2. RAxML maximum likelihood phylogenetic tree for eukaryotic members of the Ohr/OsmC family. (A) Unrooted phylogenetic tree of 392 eukaryotic sequences plus 78 selected Ohr sequences from bacteria of distinct phyla. (B) Unrooted phylogenetic tree of 186 Ohr eukaryotic sequences plus 78 selected Ohr sequences from bacteria of distinct phyla. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.).

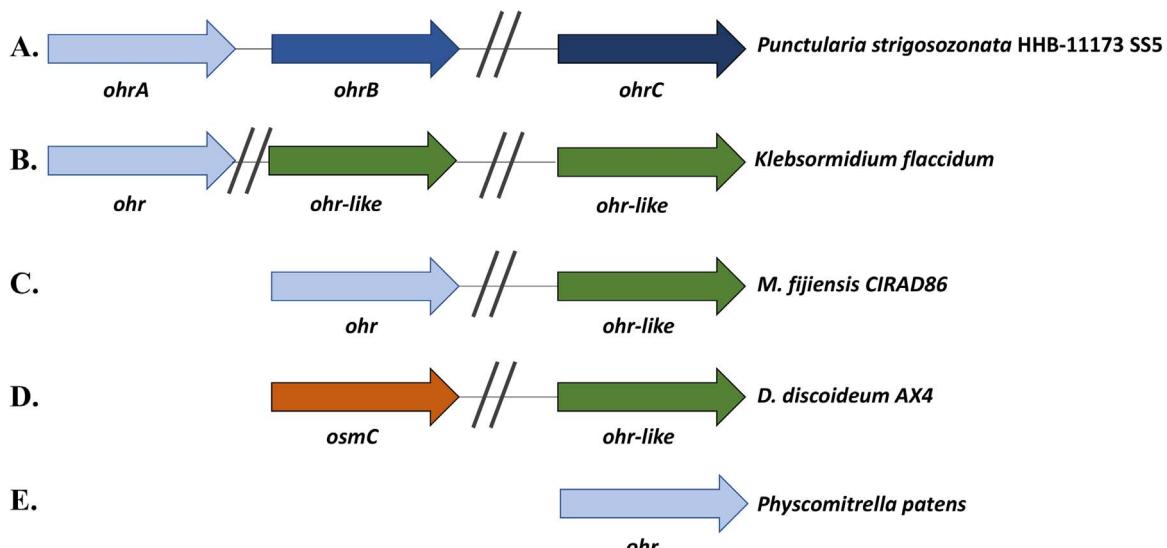


Fig. 3. Genomic arrangements of genes of the Ohr/OsmC family present in eukaryotes.

these sequences have extremely high amino acid identity to sequences from *Enterococcus* (100%), *Acetobacter* (100%), *Burkholderia* (98%) and *Oceanospirillum* (97%), respectively. Furthermore, there is no evidence of a signal peptide sequence in these animal proteins and it is most likely that these sequences are spurious, being derived from DNA from symbiotic bacteria or sample contamination [32,33]. Therefore, we did not include these sequences in our analysis.

3.2. Distribution of Ohr, OsmC and Ohr-like subfamilies homologs among eukaryotes

To gain insights on the evolutionary relationships among Ohr, OsmC and Ohr-like sequences from different eukaryotic phyla, we analyzed the data retrieved using Maximum Likelihood (ML) phylogenetic inference. This resulted in a tree with well-defined clades bearing the signatures of each family (Fig. 2A and B). The occurrences of Ohr, OsmC and Ohr-like proteins among eukaryotic phylogenetic groups are quite distinct. While Ohr and OsmC homologs are more restricted to Fungi and cellular slime molds, respectively, Ohr-like homologs are

widespread among various eukaryotic groups (Fig. 2A).

The 189 sequences from Ohr subfamily compose a well-defined group that is isolated from bacterial counterparts and are mostly present in Fungi of the Ascomycota (87/189) and Basidiomycota (98/189 sequences) phyla (Fig. 2B). In contrast, the five members of the OsmC subfamily are grouped into a single monophyletic clade restricted to the Dictyostelia order (cellular slime molds) (Fig. 2A).

Concerning the Ohr-like subfamily (198 sequences), most of them are present in Ascomycota (90 sequences), while only 16 sequences could be found in Basidiomycota. Ohr-like homologs are also abundant among Euglenozoa (48 sequences), but can also be found in non-metazoan Holozoa, such as *Sphaeroforma arctica* JP610 (two Ohr-like paralogues) and *Capsaspora owczarzaki* (one Ohr-like), some of the closest unicellular relatives of multicellular animals [34]. Interestingly, a separated analysis that included only Ohr homologs and some selected bacterial Ohrs revealed that five eukaryotic Ohr homologs grouped within the bacterial Ohr group (Fig. 2B). These sequences were encoded by genes from different species of Basidiomycota, such as *Calocera* (*C. cornea* and *C. viscosa*) and *Dacryopinax* (represented by

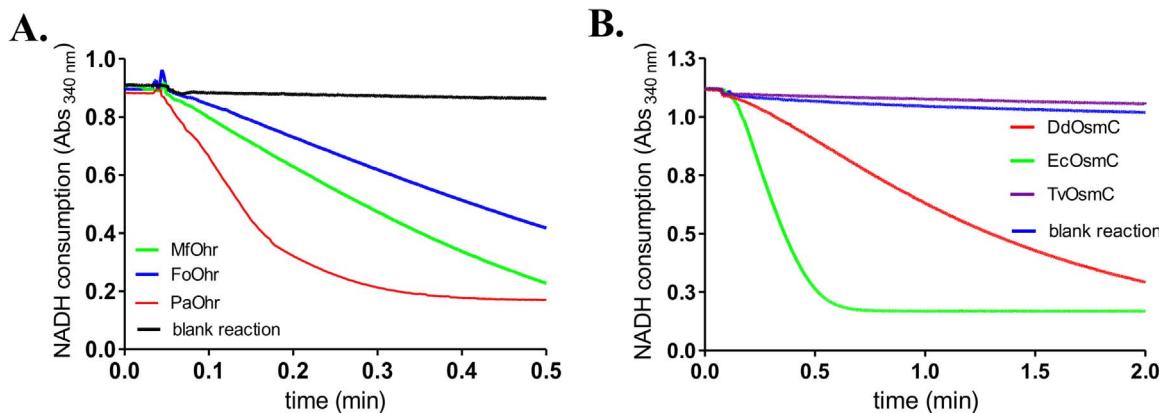


Fig. 4. Thiol dependent peroxidase activity of eukaryotic Ohr and OsmC enzymes. Peroxidase activity assay of selected eukaryotic Ohr and OsmC proteins was assessed by the lipoamide/lipoamide dehydrogenase coupled assay. The reactions were performed with 0.625 μ M of MfOhr and FoOhr (A) or 5 μ M of DdOsmC (B) in the presence of 50 μ M of reduced lipoamide, 100 μ M of DTPA, 0.5 μ M of Lpd (recombinant Dihydrolipoamide dehydrogenase from *X. fastidiosa*) and 200 μ M of NADH in 50 μ M of sodium phosphate pH 7.4. Reactions were initiated by addition of 200 μ M of CuOOH. As positive controls, we also performed the same assay using bacterial recombinant enzymes 0.1 μ M PaOhr (A) or 5 μ M of EcOsmC (B).

purple circles in the Fig. 2B) and Stramenopiles *Aphanomyces invadans* and *A. astaci* (represented by light green triangles in Fig. 2B). These latter sequences are likely examples of very recent horizontal gene transfer events from bacterial lineages, given the absence of introns in organisms such as *Aphanomyces* and their low levels of similarity of sequences from organelles and organelle related bacterial lineages.

3.3. Genomic configurations of *ohr/osmC* genes in eukaryotic organisms

Several eukaryotic genomes present more than one member of the Ohr/OsmC family, being arranged in highly variable configurations (Fig. 3). For instance, some fungi microorganisms present two or three *ohr* paralogues in their genomes (Fig. 3A and B), some located near to each other, in some cases the two gene are even neighbors (Fig. 3A), suggesting the occurrence of gene duplication events. Besides fungi, microorganisms that contain more than one gene of the Ohr/OsmC family are: *M. fijiensis* presenting one *ohr* and one *ohr-like* gene (Fig. 3C); *Trichomonas vaginalis* with four *ohr-like* genes (as also described by [22]) and *D. discoideum* AX4 containing one copy of *osmC* and one copy of an *ohr-like* gene (Fig. 3D). On the other hand, most of the other genomes encode only a single homolog of the *ohr* subfamily, as is the case of the moss *P. patens* (Fig. 3E).

We also observed that many eukaryotic *ohr/osmC* genes present introns, however their evolutionary significance is still elusive. The complete list of *ohr*, *osmC* or *ohr-like* genes (and their predicted introns), as well as their abundance in each specie, is presented in table S 1.

3.4. Recombinant eukaryotic Ohr and OsmC have peroxidase activity

To verify whether Ohr and OsmC homologs present in eukaryotic organisms also display lipooyl peroxidase activity as their bacterial counterparts, we obtained recombinant Ohr proteins from *M. fijiensis* (MfOhr) and from *F. oxysporum* (FoOhr) and recombinant OsmC from *Dictyostelium discoideum* (DdOsmC), expressed in *E. coli*. All the selected fungal Ohr enzymes reduced tBOOH at lower rates when compared with MfOhr and both proteins were less efficient peroxidases than their bacterial counterpart (PaOhr). Considering eukaryotic OsmC, DdOsmC presented about half of NADH consumption compared to the bacterial OsmC counterpart (*E. coli* BW25113) in the experimental conditions analyzed (Fig. 4B).

We chose MfOhr for further characterization as it displayed the highest activity among the eukaryotic proteins studied.

3.5. MfOhr enzymatic properties are similar to the bacterial Ohrs

Peroxidase activity of MfOhr was specifically supported by dithiols

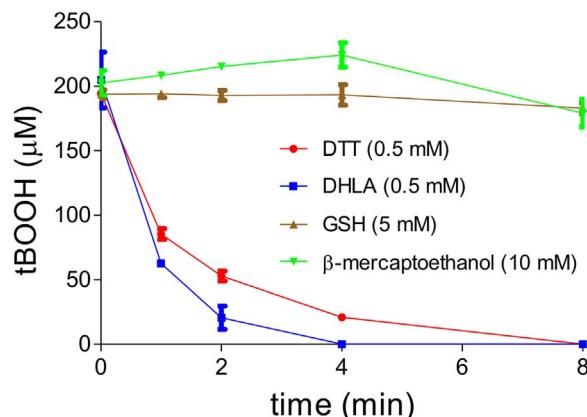


Fig. 5. Thiol specificity of MfOhr peroxidase activity. The amount of tBOOH remaining in solution after reaction was determined by the FOX assay. Reactions were initiated by addition of thiol compounds and terminated by addition of 20 μ L of HCl (5 M) into 100 μ L reaction mixtures. Reactions were carried out in 50 mM Tris-HCl buffer pH 7.4 in the presence of MfOhr (0.5 μ M), sodium azide (1 mM) and DTPA (0.1 mM). The tested reducing agents were: 5 mM reduced glutathione (GSH), 10 mM 2-mercaptoethanol, 0.5 mM Dithiothreitol (DTT) or Dihydrolipoamide (DHLA).

(DTT and DHLA) and not by monothiols (GSH and β -mercaptoethanol) (Fig. 5) and thus similar to bacterial Ohr enzymes [3].

We also analyzed MfOhr's specificity towards the oxidizing substrate, since it is well established that bacterial Ohr enzymes present higher preference for organic hydroperoxides over H_2O_2 [2–4,10]. Indeed, the specific activity of MfOhr for CuOOH was almost six times higher than the values presented for tBOOH and almost 500 times higher in comparison to H_2O_2 (Fig. 6). In conclusion, similarly to bacterial Ohr, MfOhr also displayed greater affinity for more hydrophobic substrates.

We also evaluated the specific activities of a processed version of Ohr (MfOhr_{del}), in which the first 33 amino acids residues were removed, as it is well established that the N-terminal sequence is proteolytically cleaved during import of the proteins into mitochondria. Both versions of the MfOhr (processed versus not processed) display similar specific activities values for each hydroperoxide tested (Fig. 6), suggesting that the N-terminal extension does not influence protein activity. In the following assays, we then chose to use the processed version of MfOhr (MfOhr_{del}).

Since tBOOH and CuOOH are synthetic compounds, we decided to evaluate the ability of MfOhr to reduce more complex hydroperoxides, such as fatty acid hydroperoxides. In fact, we recently described that hydroperoxides derived from oleic, linoleic and arachidonic fatty acids

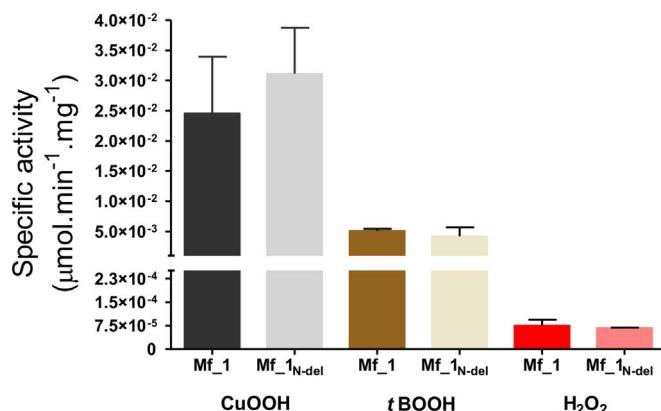


Fig. 6. Specific activities of MfOhr and MfOhr_{del} towards CuOOH, tBOOH and H₂O₂. The values were calculated for the wild type (173 amino acids, MfOhr) or truncated (140 amino acids, MfOhr_{del}) versions of Mf₁ Ohr, using the lipoamide/lipoamide dehydrogenase coupled assay. Initial rates were obtained from the linear portion of the curves from reactions performed at 0.075, 0.1, 0.25 and 0.5 μM of enzyme for tBOOH, 0.025, 0.05, 0.075 and 0.15 μM of enzyme for CuOOH and 10, 12 and 15 μM of enzyme for H₂O₂.

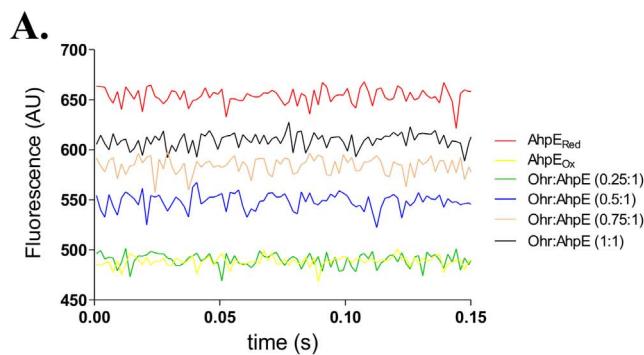


Fig. 7. Kinetics of LAOOH reduction by MfOhr. **A.** Reaction of MfOhr_{del} with LAOOH was investigated by a competitive assay following the intrinsic tryptophan fluorescence emission ($\lambda_{ex}=290$ nm and $\lambda_{em}=340$ nm) of 2 μM AhpE [11]. The red and yellow lines represent the emission fluorescence of AhpE in its reduced (no LAOOH) and oxidized (added 1.8 μM LAOOH) states; in the absence of MfOhr_{del}. In the competition assay, reduced AhpE was mixed with 0.5 (green line), 1 (blue line), 1.5 (brown line) and 2 μM (black line) of reduced MfOhr_{del} in the presence of 1.8 μM LAOOH. **B.** The fraction of oxidized AhpE (AhpE_{Ox}) decreases with increasing amount of MfOhr_{del}. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

are the biological substrates of bacterial Ohr, at least for enzymes from *P. aeruginosa* and *X. fastidiosa* [11]. Therefore, we determined the second order rate constant for the reaction between the reduced MfOhr_{del} and linoleic acid hydroperoxide (LAOOH) by employing a competitive approach that follows redox dependent changes in the AhpE intrinsic fluorescence [11]. Like the bacterial enzymes, MfOhr_{del} displayed an extraordinarily high rate constant (3.2 (± 2.1) $\times 10^8$ M⁻¹ s⁻¹) for LAOOH reduction (Fig. 7A and B).

3.6. Single Cys mutants of MfOhr do not have detectable peroxidase activity

To evaluate the catalytic role of Cys residues of MfOhr, we generated single mutants for each residue. Both mutants lost their peroxidase activity as assessed by lipoamide/lipoamide dehydrogenase coupled assay and FOX assay (Fig. 8). Similar results were observed for Ohr from *X. fastidiosa* [3]. These results suggest the C_r might have a role in activating C_p for hydroperoxide reduction.

3.7. Determination of cysteine's pK_a values

All thiol peroxidases so far described carry a reactive Cys, the so called C_p, whose thiolate group displays an acidic pK_a [35]. Therefore,

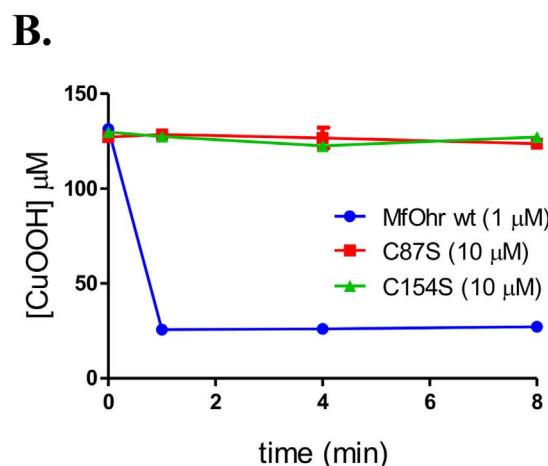
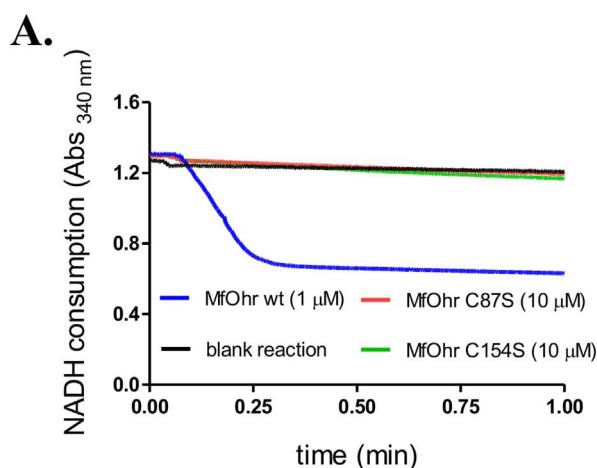
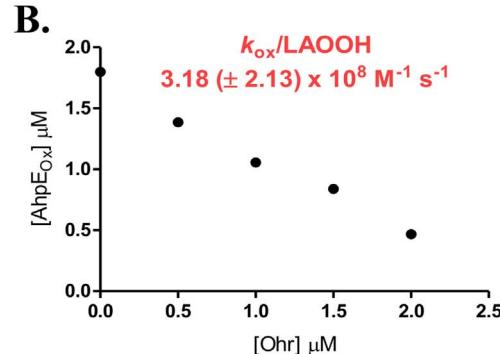


Fig. 8. Comparison of the peroxidase activities of MfOhr_{del} and the C87S and C154S mutants. **A.** Lipoamide/lipoamide dehydrogenase coupled assay. The reactions were performed at 37 °C with 1 μM MfOhr_{del} (blue line) or 10 μM mutant proteins (C87S, red line or C154S, green line), in the presence of 50 μM reduced lipoamide, 100 μM DTPA, 0.5 μM XflPd and 200 μM NADH in 50 μM sodium phosphate pH 7.4. Reactions were initiated by addition of 200 μM CuOOH. Blank reaction (black line) was performed without enzyme. **B.** The consumption of CuOOH was monitored during 8 min using FOX assay. The reactions were carried out in the presence of 1 μM (MfOhr_{del}) or 10 μM (C154S or C86S) enzymes. The control reactions for each tested hydroperoxide (enzyme + peroxide without DTT) and (hydroperoxide + DTT without enzyme) are not showed here. The figure is representative of at least two independent sets of experiments. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

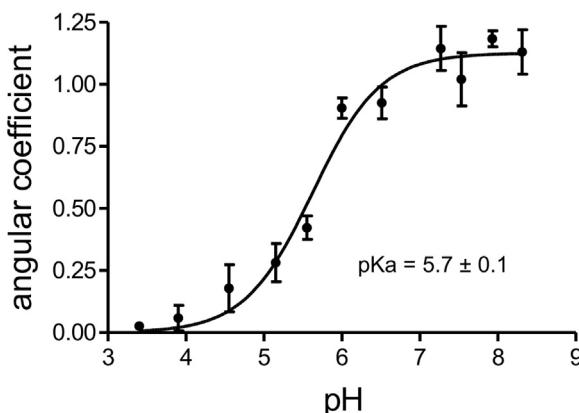


Fig. 9. pKa value of Cp residue of MfOhr_{del}. Monobromobimane alkylation was performed using 4 μ M pre-reduced MfOhr_{del} and 8 μ M monobromobimane in the presence of 15 mM acetic acid, 15 mM MES [2-(N-Morpholino Ethanesulfonic Acid] and 30 mM Tris-HCl buffer adjusted to pH from 3.5 until 9.0. The determined pKa value of Cp from MfOhr_{del} was 5.7 (\pm 0.1), according to non-linear regression using Henderson-Hasselbalch equation (GraphPad Software). This figure is representative of two independent sets of experiments.

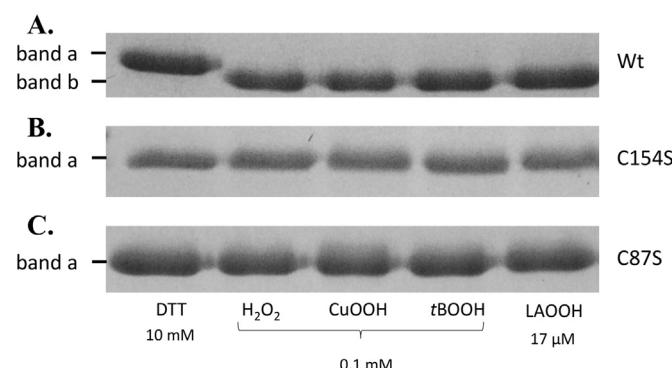


Fig. 10. Non-reducing SDS-PAGE gels showing the effect of DTT and hydroperoxide treatments on MfOhr_{del} (A), MfOhr_{del} C154S (B) and MfOhr_{del} C87S (C). 10 μ M of each protein were incubated during 1 h at 37 °C with 10 mM DTT, 0.1 mM H₂O₂, CuOOH or tBOOH or 17 μ M linoleic acid hydroperoxide (LAOOHOH). All reactions were carried out in a buffer containing 0.5 M NaCl, 20 mM sodium phosphate pH 7.4 and 1 mM DTPA. Immediately after DTT or hydroperoxides treatments, all the samples were alkylated with NEM (100 mM) for 1 h at room temperature to avoid oxidation artefacts due to protein denaturation by SDS.

we decided to determine the pKa value of Cp of MfOhr_{del} by the monobromobimane alkylation method [29]. The curve that best fitted to the experimental data was obtained by nonlinear regression (Henderson-Hasselbach equation) and resulted in a pKa value of 5.7 \pm 0.1 for the Cp residue (Fig. 9). This value is very similar to that previously described for bacterial type Ohr, 5.3 \pm 0.1 [35]. We were unable to detect the pKa of resolving Cys probably because this residue is deeply buried in the polypeptide backbone, as observed for bacterial Ohr enzymes, whose structures were elucidated [25]. Indeed, MfOhr C87S did not display any fluorescence upon mBrB treatment, supporting the hypothesis that Cr (Cys 154) is inaccessible to this alkylating agent under the experimental conditions employed here (data not shown).

3.8. MfOhr intramolecular disulfide bond formation upon hydroperoxide treatment

We next studied the thiol redox state of Cys residue in response to hydroperoxides by non-reducing SDS-PAGE, since the intramolecular disulfide bond of Ohr enzymes can be detected due to its lower hydrodynamic volume as a band (band b) that migrates faster than the reduced state (band a) [14]. Wt, C87S and C154S MfOhr were exposed to reducing (10 mM of DTT) or oxidative conditions (0.1 mM of CuOOH, tBOOH or H₂O₂ and 0.017 mM of LAOOHOH) during 1 h at 37 °C. For the Wt MfOhr, we observed the appearance of band b upon oxidation as expected since it corresponds to the intramolecular disulfide (Fig. 10A). Band b was not observed when Cp or Cr residues were independently substituted by serine residues. In this case, a single band (band a) was observed that migrated equally regardless of conditions (Fig. 10B and C).

Therefore, again as bacterial enzymes, MfOhr is oxidized to a stable intramolecular disulfide upon oxidation by hydroperoxides.

3.9. Is MfOhr targeted to mitochondria?

Careful analysis of eukaryotic Ohr/OsmC sequences revealed that in most cases these sequences are longer than bacterial Ohr sequences (Table S1). The eukaryotic sequences contain an N-terminal extension that could harbor a signal peptide sequence for organelar localization or for extracellular secretion. Indeed, analysis of all 392 sequences by the TargetP and [28] and Mitofates [36] methods predicted that most of these proteins are addressed to mitochondria or another organelle ($p > 90\%$) (Table S1).

To experimentally verify if MfOhr is in fact a mitochondrial protein, we performed the subcellular fractionation of *M. fijiensis* protoplast

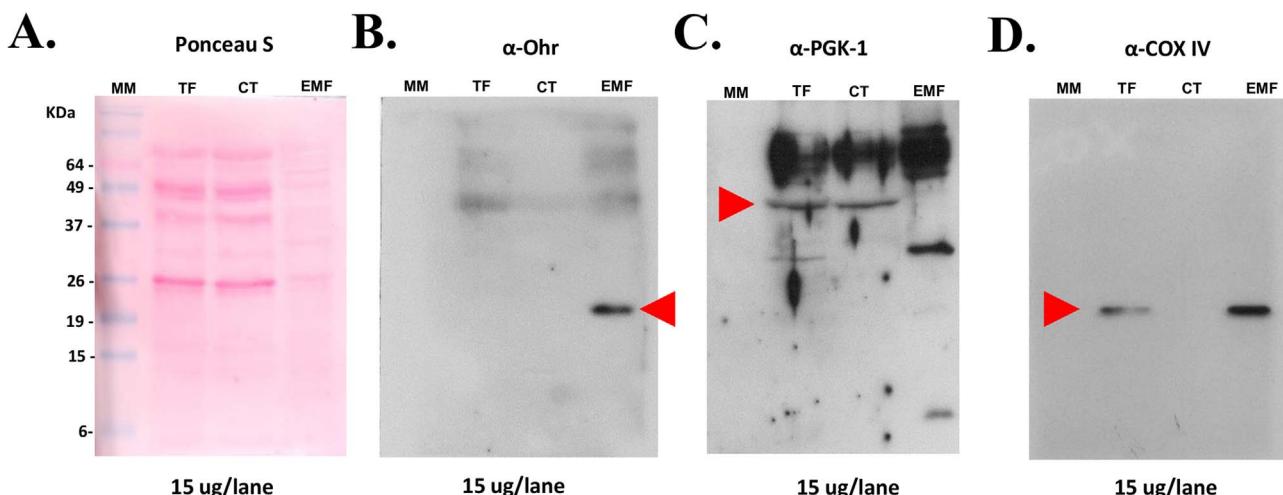


Fig. 11. Western blots of total (TF), cytosolic (CF) and enriched mitochondria (EMF) fractions of protoplasts cells of *M. fijiensis* Mf_1. Fractions of *M. fijiensis* protoplasts are described in Material and Methods. A. Loading control (ponceau staining) of cellular fractions. After western blot, membrane was probed with affinity purified MfOhr polyclonal antibody (B); PGK-1, a cytoplasmic marker (C) and COX-IV, a mitochondrial marker (D), respectively.

cells, followed by western blot analysis. Initially, the affinity of purified Ohr antibody raised against bacterial Ohr was shown to be able to detect recombinant MfOhr_{del} (Fig. S2). However, MfOhr could not be detected in whole extracts of *M. fijiensis* mycelia grown in PDB medium, even when high amounts of total protein (200–300 µg) were employed. In contrast, a strong signal was observed in the enriched mitochondrial fraction (Fig. 11B). This is likely due to a dilution effect as the mitochondria occupy only a small fraction of the whole cellular mass. Indeed, COX IV, a well-established and abundant mitochondrial protein, was detected in whole extract at significantly lower levels than in the enriched mitochondrial fraction (Fig. 11D). As another control, the cytoplasmic protein PGK-1 was present in the total and cytoplasmic fraction but not in the mitochondrial fraction (Fig. 11C). Taken together, these results confirm the *in silico* prediction that MfOhr is a mitochondrial protein.

4. Discussion

Initially thought to be exclusively found in prokaryotes, Ohr proteins have been described as the main enzymatic system involved in bacterial defense against organic hydroperoxides [5,7,9–11,35,37]. We show here that members of the Ohr/OsmC family are also present in several eukaryotic clades and are especially common among species of Fungi. To validate these *in silico* observations, biochemical characterization of selected proteins was carried out and our results indicated that these eukaryotic peroxidases are enzymatically similar to their bacterial counterparts.

Furthermore, we also demonstrated, not only for the Ohr subfamily but also for almost all eukaryotic Ohr/OsmC proteins, that the N-terminal signal sequence is predicted to localize to mitochondria or another organelle, such as the peroxisome or chloroplasts (Table S1). The presence of Ohr in mitochondria is in agreement with the fact that the proposed reducing system, *i.e.* lipoylated proteins from α-ketoacid dehydrogenase complexes [4], is also present in mitochondria. These findings are also consistent with the observation that mitochondria is a major source of endogenous oxidants [38,39]. It is reasonable to think that for eukaryotes, the peroxidase activity of Ohr may be related with detoxification of endogenous sources of hydroperoxides and might be not involved in defense towards exogenous insults of ROS, as it is currently proposed for bacteria [11,40,41].

It is noteworthy, that several species presenting Ohr homologs in eukaryotes are non-vascular plant or animal pathogens (Table S1), such as *M. fijiensis*, the causative agent of Black Sigatoka, the most important disease of banana and plants worldwide [42]. Remarkably, when we looked at the sequenced genomes currently available, we found that Ohr enzymes are completely absent in animals and vascular plants, although these organisms are hosts for microbial pathogens, thus making Ohr proteins a convenient target for drug development.

OsmC homologs also display thiol dependent peroxidase activity and show preference for organic hydroperoxides [43–46]. We also found OsmC enzymes in eukaryotes, but in this case the taxonomic distribution is restricted to some species within Dictyostelia. Interestingly, the *osmC* gene from *D. discoideum* AX4 was previously suggested to have been acquired via lateral gene transfer [47] but never had its peroxidase activity reported. To our knowledge, this is the first study that actually determined the peroxidase activity for an OsmC enzyme from *Dictyostelium* or any other eukaryotic organism.

Classification of proteins in the Ohr/OsmC family that do not belong to the Ohr and OsmC subfamilies were already described in the literature [1]. However, in these studies low numbers of sequences were analyzed. Here, Ohr-like sequences (not belonging to Ohr or OsmC subfamilies) were grouped together (Fig. 2), but we are aware that further studies are required for proper classification of these enzymes and an analysis including all available sequences of Ohr-like enzymes is currently under investigation in our laboratory.

Recently, the peroxidase activity of a Ohr-like enzyme from *T.*

vaginalis was described [22] (Genbank accession no. XP_001323255). This protein was named TvOsmC, although it does not have the conserved Arg and Glu residues characteristic of the OsmC subfamily (Fig. 1B and C). In our experiments, TvOsmC did not display peroxidase activity (Fig. 4B and S1, respectively). In contrast, the peroxidase activity of TvOsmC was detected by Nývllová et al., [19]. Possibly, L and H (lipoylated) proteins from hydrogenosomes of *T. vaginalis* are required to support the peroxidase activity of this enzyme.

In summary, we showed that Ohr/OsmC proteins, mostly present in bacteria, also occur among eukaryotes, and are mostly targeted to organellar compartments. Although it is currently proposed that these genes were acquired from prokaryotes through lateral gene transfer events [22,47] and we did describe some cases for recent transfer events, our phylogeny cannot confirm nor negate the hypothesis of ancient transfers due to low bootstrap values in the deep branches of the Ohr/OsmC tree (Fig. 2A). On the other hand, to assume that members of the eukaryotic Ohr subgroup, which only includes genes from fungi, originate from endosymbiont-derived genes present in the last common ancestor of all eukaryotes would require multiple gene losses at the root of different eukaryotic lineages [48,49]. A more parsimonious explanation is that lateral gene transfer from bacteria to a lineage close to the common ancestor of extant fungal lineages was responsible for the unique presence of Ohr among fungi. As sequence databases grow and more sequences are added, further evolutionary studies will undoubtedly help improve our understanding of the origin and evolution of proteins from the Ohr/OsmC family across the many branches in the tree of life.

Acknowledgements

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, process 2013/07937-8 (Redox Processes in Biomedicine -REDOXOMA). D.A.M was recipient of a fellowship from FAPESP, process 2012/21722-1. We thank Dr. Miguel J. Beltrán-García from Departamento de Química, Universidad Autónoma de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco México and Dr. Aline Maria da Silva and Dr. Layla Farage Martins from Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil for kindly provide the *M. fijiensis* Mf_1 and *D. discoideum* AX4 strain, respectively.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.redox.2017.03.026.

References

- [1] D.H. Shin, I.-G. Choi, D. Busso, J. Jancarik, H. Yokota, R. Kim, S.-H. Kim, Structure of OsmC from *Escherichia coli*: a salt-shock-induced protein, Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 60 (2004) 903–911, <http://dx.doi.org/10.1107/S090444904005013>.
- [2] J. Lesniak, W.A. Barton, D.B. Nikolov, Structural and functional characterization of the *Pseudomonas* hydroperoxide resistance protein Ohr, EMBO J. 21 (2002) 6649–6659.
- [3] J.R.R. Cussiol, S.V. Alves, M.A. de Oliveira, L.E.S. Netto, Organic hydroperoxide resistance gene encodes a thiol-dependent peroxidase, J. Biol. Chem. 278 (2003) 11570–11578, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M300252200>.
- [4] J.R.R. Cussiol, T.G.P. Alegria, L.I. Szewda, L.E.S. Netto, Ohr (organic hydroperoxide resistance protein) possesses a previously undescribed activity, lipoyl-dependent peroxidase, J. Biol. Chem. 285 (2010) 21943–21950, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.117283>.
- [5] S. Mongkolsuk, W. Praituan, S. Loprasert, M. Fuangthong, S. Chamnongpol, Identification and characterization of a new organic hydroperoxide resistance (ohr) gene with a novel pattern of oxidative stress regulation from *Xanthomonas campestris* pv. Phaseoli Identification and characterization of a new organic hydroperoxide resi, J. Bacteriol. 180 (1998) 2636–2643.
- [6] S. Atichartpongkul, S. Loprasert, P. Vattanaviboon, W. Whangsuk, J.D. Helmann, S. Mongkolsuk, Bacterial Ohr and OsmC paralogues define two protein families with distinct functions and patterns of expression, Microbiology 147 (2001) 1775–1782, <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11429455>>.

- [7] T. Chuchue, W. Tanboon, J.M. Dubbs, P. Vattanaviboon, S. Mongkolsuk, B. Prapagdee, ohrR and ohr are the Primary Sensor/Regulator and Protective Genes Against Organic Hydroperoxide Stress in Agrobacterium tumefaciens ohrR and ohr are the Primary Sensor/Regulator and Protective Genes against Organic Hydroperoxide Stress in Agrobacteria, 2006. doi: <<http://doi.org/10.1128/JB.188.3.842>>.
- [8] A. Conter, C. Gangneux, M. Suzanne, C. Gutierrez, Survival of Escherichia coli during long-term starvation: effects of aeration, NaCl, and the rpoS and osmC gene products, *Res. Microbiol.* 152 (2001) 17–26, <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1281321>>.
- [9] J.F. da Silva Neto, C.C. Negretto, L.E.S. Netto, Analysis of the organic hydroperoxide response of chromobacterium violaceum reveals that OhrR is a cys-based redox sensor regulated by thioredoxin, *PLoS One* 7 (2012) e47090, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0047090>.
- [10] M. Si, J. Wang, X. Xiao, J. Guan, Y. Zhang, W. Ding, M.T. Chaudhry, Y. Wang, X. Shen, Ohr protects corynebacterium glutamicum against organic hydroperoxide induced oxidative stress, *PLoS One* 10 (2015) e0131634, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0131634>.
- [11] T.G.P. Alegria, D.A. Meireles, J.R.R. Cussiol, M. Hugo, M. Trujillo, M.A. de Oliveira, S. Miyamoto, R.F. Queiroz, N.F. Valadares, R.C. Garratt, R. Radi, P. Di Mascio, O. Augusto, L.E.S. Netto, Ohr plays a central role in bacterial responses against fatty acid hydroperoxides and peroxy nitrite, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 114 (2017) E132–E141, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1619659114>.
- [12] L.M.S. Baker, L.B. Poole, Catalytic mechanism of thiol peroxidase from Escherichia coli, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 9203–9211, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M209888200>.
- [13] K.J. Nelson, S.T. Knutson, L. Soito, C. Klomsiri, B. Leslie, J.S. Fetrow, Analysis of the Peroxiredoxin Family: Using Active Site Structure and Sequence Information for Global Classification and Residue Analysis, vol. 79, 2012, pp. 947–964. doi: <<http://doi.org/10.1002/prot.22936.analys>>.
- [14] M. a. Oliveira, B.G. Guimarães, J.R.R. Cussiol, F.J. Medrano, F.C. Gozzo, L.E.S. Netto, Structural insights into enzyme-substrate interaction and characterization of enzymatic intermediates of organic hydroperoxide resistance protein from Xylella fastidiosa, *J. Mol. Biol.* 359 (2006) 433–445, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2006.03.054>.
- [15] G.M. Boratyn, A. a. Schäffer, R. Agarwala, S.F. Altschul, D.J. Lipman, T.L. Madden, Domain enhanced lookup time accelerated BLAST, *Biol. Direct* 7 (2012) 12, <http://dx.doi.org/10.1186/1745-6150-7-12>.
- [16] R.D. Finn, J. Clements, S.R. Eddy, HHMMER web server: interactive sequence similarity searching, *Nucleic Acids Res.* 39 (2011) 29–37, <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkr367>.
- [17] Y. Huang, B. Niu, Y. Gao, L. Fu, W. Li, CD-HIT Suite: a web server for clustering and comparing biological sequences, *Bioinformatics* 26 (2010) 680–682, <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btq003>.
- [18] K. Katoh, D.M. Standley, MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability, *Mol. Biol. Evol.* 30 (2013) 772–780, <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/mst010>.
- [19] A. Stamatakis, Stamatakis – 2014 – RAxML Version 8 a Tool for Phylogenetic Analysis and Post-analysis of Large Phylogenies, 2014, pp. 2010–2011.
- [20] S. Kumar, G. Stecher, K. Tamura, MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets, *Mol. Biol. Evol.* 33 (2016) msy054, <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msy054>.
- [21] S. Cornillon, C. Foa, J. Davoust, N. Buonavista, J.D. Gross, P. Golstein, Programmed cell death in *Dicytostelium*, *J. Cell Sci.* 107 (1994) 2691–2704, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.01.018>.
- [22] E. Nývlítová, T. Smutná, J. Tachezy, I. Hrdý, OsmC and incomplete glycine decarboxylase complex mediate reductive detoxification of peroxides in hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis*, *Mol. Biochem. Parasitol.* (2015). <http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2016.01.006>.
- [23] B.A. Gasteiger E, C. Hoogland, A. Gattiker, S. Duvaud, M.R. Wilkins, R.D. Appel, Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server, *Proteom. Protoc. Handb.* (2005) 571–607, <http://dx.doi.org/10.1385/1592598900>.
- [24] G.L. Ellman, Tissue sulfhydryl groups, *Arch. Biochem. Biophys.* 82 (1959) 70–77.
- [25] Z.Y. Jiang, J.V. Hunt, S.P. Wolff, Ferrous ion oxidation in the presence of xylene orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein, *Anal. Biochem.* 202 (1992) 384–389, <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1519766>>.
- [26] K.F. Discola, M.A. de Oliveira, J.R. Rosa Cussiol, G. Monteiro, J.A. B??rcena, P. Porras, C.A. Padilla, B.G. Guimar??es, L.E.S. Netto, Structural aspects of the distinct biochemical properties of glutaredoxin 1 and glutaredoxin 2 from *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Mol. Biol.* 385 (2009) 889–901, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2008.10.055>.
- [27] R. Bryk, Metabolic enzymes of mycobacteria linked to antioxidant defense by a thioredoxin-Like protein, *Science* 295 (80–) (2002) 1073–1077, <http://dx.doi.org/10.1126/science.1067798>.
- [28] M. Trujillo, G. Ferrer-Sueta, R. Radi, Chapter 10 kinetic studies on peroxy nitrite reduction by peroxiredoxins, *Methods Enzymol.* 441 (2008) 173–196, [http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(08\)01210-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(08)01210-X).
- [29] F. Sardi, B. Manta, S. Portillo-Ledesma, B. Knoops, M.A. Comini, G. Ferrer-Sueta, Determination of acidity and nucleophilicity in thiols by reaction with monobromobimane and fluorescence detection, *Anal. Biochem.* 435 (2013) 74–82, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2012.12.017>.
- [30] H. Schagger, W.A. Cramer, G. Vonjagow, Mitochondrial biogenesis and genetics Part A, *Anal. Biochem.* 217 (1994) 220–230, [http://dx.doi.org/10.1016/0076-6879\(95\)60139-2](http://dx.doi.org/10.1016/0076-6879(95)60139-2).
- [31] C.E. Hinckliff, S.A. Smith, J.F. Allman, J.G. Burleigh, R. Chaudhary, L.M. Coghill, K.A. Crandall, J. Deng, B.T. Drew, R. Gazis, K. Gude, D.S. Hibbett, L.A. Katz, H.D. Laughinghouse, E.J. McTavish, P.E. Midford, C.L. Owen, R.H. Ree, J.A. Rees, D.E. Soltis, T. Williams, K.A. Cranston, Synthesis of phylogeny and taxonomy into a comprehensive tree of life, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112 (2015) 201423041, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1423041112>.
- [32] G. Koutsouvolos, S. Kumar, D. Laetsch, L. Stevens, J. Daub, C. Conlon, No evidence for extensive horizontal gene transfer in the genome of the tardigrade *Hypsibius dujardini*, *PNAS* 113 (2016) 1–6, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1600338113>.
- [33] S.J. Salter, M.J. Cox, E.M. Turek, S.T. Calus, W.O. Cookson, M.F. Moffatt, P. Turner, J. Parkhill, N.J. Loman, A.W. Walker, Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses, *BMC Biol.* 12 (2014) 87, <http://dx.doi.org/10.1186/s12915-014-0087-z>.
- [34] K. Schalchian-Tabrizi, M.A. Minge, M. Espelund, R. Orr, T. Ruden, K.S. Jakobsen, T. Cavalier-Smith, Multigenic phylogeny of Choanozoa and the origin of animals, *PLoS One* 3 (2008) <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0002098>.
- [35] D. de, A. Meireles, T.G. eronimo, P. Alegria, S.V. idigal Alves, C.R. ani, R. Arantes, L.E. duardo, S. Netto, A 14.7 kDa protein from *Francisella tularensis* subsp. novicida (named FTN_1133), involved in the response to oxidative stress induced by organic peroxides, is not endowed with thiol-dependent peroxidase activity, *PLoS One* 9 (2014) e99492, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0099492>.
- [36] Y. Fukasawa, J. Tsuji, S.-C. Fu, K. Tomii, P. Horton, K. Imai, MitoFates: improved prediction of mitochondrial targeting sequences and their cleavage sites, *Mol. Cell. Proteom.* 14 (2015) 1113–1126, <http://dx.doi.org/10.1074/mcp.M114.043083>.
- [37] C. Fontenelle, C. Blanco, M. Arrieta, V. Dufour, A. Trautwetter, Resistance to organic hydroperoxides requires ohr and ohrR genes in *Sinorhizobium meliloti*, *BMC Microbiol.* 11 (2011) 100, <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-11-100>.
- [38] M.P. Murphy, How mitochondria produce reactive oxygen species, *Biochem. J.* 417 (2009) 1–13, <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20081386>.
- [39] C.L. Quinlan, R.L.S. Goncalves, M. Hey-Mogensen, N. Yadava, V.I. Bunik, M.D. Brand, The 2-oxoacid dehydrogenase complexes in mitochondria can produce superoxide/hydrogen peroxide at much higher rates than complex I, *J. Biol. Chem.* 289 (2014) 8312–8325, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M113.545301>.
- [40] J. Liu, Zhi Wang, Hui Zhou, Zhigang Sheng, Ying Naseer, Nawar Kan, Biao, Zhu, Thiol-based switch mechanism of virulence regulator AphB modulates oxidative stress response in *Vibrio cholerae*, *Clin. Exp. Immunol.* 102 (2016) 939–949, <http://dx.doi.org/10.1111/joms.12099>.
- [41] M.L. Reniere, A.T. Whiteley, D.A. Portnoy, An in vivo selection identifies *Listeria monocytogenes* Genes required to sense the intracellular environment and activate virulence factor expression, *PLoS Pathog.* 12 (2016) 1–27, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1005741>.
- [42] A.C.L. Churchill, *Mycosphaerella fijiensis*, the black leaf streak pathogen of banana: progress towards understanding pathogen biology and detection, disease development, and the challenges of control, *Mol. Plant Pathol.* 12 (2011) 307–328, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00672.x>.
- [43] S. Saikolappan, K. Das, S.J. Sasindran, C. Jagannath, S. Dhandayuthapani, OsmC proteins of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium smegmatis* protect against organic hydroperoxide stress, *Tuberculosis* 91 (Suppl 1) (2011) S119–S127, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tube.2011.10.021>.
- [44] W. Zhang, J.B. Baseman, Functional characterization of osmotically inducible protein C (MG_427) from *Mycoplasma genitalium*, *J. Bacteriol.* 196 (2014) 1012–1019, <http://dx.doi.org/10.1128/JB.00954-13>.
- [45] J. Lesniak, W.A. Barton, D.B. Nikolov, Structural and functional features of the *Escherichia coli* hydroperoxide resistance protein OsmC, *Protein Sci.* 12 (2003) 2838–2843, <http://dx.doi.org/10.1101/p.03375603>.
- [46] S.-C. Park, B.P. Pham, L. Van Duyet, B. Jia, S. Lee, R. Yu, S.W. Han, J.-K. Yang, K.-S. Hahn, G.-W. Cheong, Structural and functional characterization of osmotically inducible protein C (OsmC) from *Thermococcus kodakaraensis* KOD1, *Biochim. Biophys. Acta* (2008) 1784 783–788, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.02.002>.
- [47] L. Eichinger, J.A. Pachebat, G. Glöckner, M. Rajandream, R. Sucgang, M. Berriman, J. Song, R. Olsen, K. Szafrański, Q. Xu, B. Tunggal, S. Kummerfeld, M. Madera, B.A. Konfortov, F. Rivero, A.T. Bankier, R. Lehmann, N. Hamlin, R. Davies, P. Gaudet, P. Fey, K. Pilcher, G. Chen, D. Saunders, E. Sodergren, P. Davis, A. Kerhornou, X. Nie, N. Hall, C. Anjard, L. Hemphill, N. Bason, P. Farbrother, B. Desany, E. Just, T. Morio, R. Rost, C. Churcher, J. Cooper, S. Haydock, N. van Driessche, A. Cronin, I. Goodhead, D. Muzny, T. Mourier, A. Pain, M. Lu, D. Harper, R. Lindsay, H. Hauser, K. James, M. Quiles, M. Madan Babu, T. Saito, C. Buchrieser, A. Wardrop, M. Felder, M. Thangavelu, D. Johnson, A. Knights, H. Loulseged, K. Mungall, K. Oliver, C. Price, M.A. Quail, H. Urushihara, J. Hernandez, E. Rabinowitz, D. Steffen, M. Sanders, J. Ma, Y. Kohara, S. Sharp, M. Simmonds, S. Spiegler, A. Tievy, S. Sugano, B. White, D. Walker, J. Woodward, T. Winckler, Y. Tanaka, G. Shaulsky, M. Schleicher, G. Weinstock, A. Rosenthal, E.C. Cox, R.L. Chisholm, R. Gibbs, W.F. Loomis, M. Platzer, R.R. Kay, J. Williams, P.H. Dear, A.A. Noegel, B. Barrell, A. Kuspa, The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*, *Nature* 435 (2005) 43–57, <http://dx.doi.org/10.1038/nature03481>.
- [48] C. Ku, W.F. Martin, A natural barrier to lateral gene transfer from prokaryotes to eukaryotes revealed from genomes: the 70% rule, *BMC Biol.* 14 (2016) 89, <http://dx.doi.org/10.1186/s12915-016-0315-9>.
- [49] C. Ku, S. Nelson-sathi, M. Roettger, F.L. Sousa, P.J. Lockhart, D. Bryant, E. Hazkani-covo, J.O. Mcinerney, G. Landan, W.F. Martin, Endosymbiotic origin and differential loss of eukaryotic genes, *Nature* 524 (2015) 427–437, <http://dx.doi.org/10.1038/nature14963>.

1 **Genetic inactivation of the phospholipase A₂ activity of peroxiredoxin 6 in mice protects against LPS-induced**
2 **acute lung injury**

4 José Pablo Vázquez-Medina^{1,2}, Jian-Quin Tao¹, Priyal Patel¹, Renata Bannitz-Fernandes¹, Chandra Dodia¹, Elena M.
5 Sorokina¹, Sheldon I. Feinstein¹, Shampa Chatterjee¹, and Aron B. Fisher^{1*}.

6 ¹Institute for Environmental Medicine, Department of Physiology, Perelman School of Medicine, University of
7 Pennsylvania, Philadelphia, PA; ²Department of Integrative Biology, University of California, Berkeley, CA.

9 **Running title:** Prdx6 in ALI

11 ***Corresponding author:**

12 Aron B. Fisher, M.D.

13 Institute for Environmental Medicine, University of Pennsylvania

14 3620 Hamilton Walk, 1 John Morgan Building

15 Philadelphia, PA 19104

16 Phone: 215-898-9100 Fax: 215-898-0868

17 e-mail: abf@upenn.edu

19 **Author contributions**

20 JPV-M, SC and ABF conceived and designed the experiments. JPV-M and JQT performed animal studies. CD conducted
21 PLA₂ activity assays and performed isolated lung perfusion. EMS performed peroxidase activity assays, genotyped the
22 mice and helped with fluorescence microscopy. JPV-M, PP and RBF performed cell studies. SIF designed constructs and
23 knock-in mice. JPV-M, SC,SIF and ABF interpreted the data. JPV-M and ABF wrote the manuscript. All authors discussed
24 the results, commented on the manuscript and approved its final version.

30

31 **Abstract**

32 Peroxiredoxin 6 (Prdx6) is a multi-functional enzyme that serves important anti-oxidant roles by scavenging
33 hydroperoxides and reducing peroxidized cell membranes. Prdx6 also plays a key role in cell signaling by the activation of
34 NADPH oxidase, type 2 (Nox2) through its phospholipase A₂ (aiPLA₂) activity. Nox2 generation of O₂⁻, in addition to
35 signaling, can contribute to oxidative stress and inflammation such as during sepsis-induced acute lung injury (ALI). To
36 evaluate a possible role of Prdx6-aiPLA₂ activity in the pathophysiology of ALI, wild type (WT) and Prdx6-D140A mice
37 which lack aiPLA₂ but retain peroxidase activity were administered intraperitoneal LPS. LPS-treated mutant mice had
38 increased survival compared to WT mice while cytokines in lung lavage fluid and lung tissue VCAM-1 expression,
39 nitrotyrosine content, PMN infiltration, and permeability increased in WT but not in mutant mice. Exposure of mouse
40 pulmonary microvascular endothelial cells in primary culture to LPS promoted phosphorylation of Prdx6, its translocation
41 to plasma membrane, and increased aiPLA₂ activity as well as increased H₂O₂ generation, nitrotyrosine content, lipid
42 peroxidation, NFkB nuclear localization, and NLRP3 inflammasome assembly; these effects were not seen in Nox2 null
43 cells, Prdx6-D140A cells, or WT cells pre-treated with MJ33, an inhibitor of aiPLA₂ activity. Thus, aiPLA₂ activity is needed
44 for Nox2-generated oxidant stress associated with LPS exposure. Since inactivation of aiPLA₂ reduced mortality and
45 prevented lung inflammation and oxidative stress in this animal model, the aiPLA₂ activity of Prdx6 could be a novel target
46 for prevention or treatment of sepsis-induced ALI.

47

48 **Key words:** endothelial cells; Prdx6 phosphorylation; MJ33; mutant Prdx6; NOX2 inhibition

49

Slight divergences between Tsa1 and Tsa2 of *Saccharomyces cerevisiae* determine differences on hydroperoxide preference, susceptibility to overoxidation and formation of HMW complexes

Carlos Alexandre Breyer¹, Alexandre Cassago², Renata Bannitz Fernandes³, Carlos Tairum Jr¹, Luis Eduardo Soares Netto³, Rodrigo Portugal² and Marcos Antonio de Oliveira^{1*}

[†]This work was supported by grants 07/50930-3 and 13/07937-8 from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

¹Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho Campus do Litoral Paulista São Vicente, Brazil, 11330-900.

²Laboratório Nacional de Nanotecnologia, Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, Campinas, São Paulo Brazil, 13083-970.

³Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, 05508-090.

*To whom correspondence should be addressed: Marcos A. de Oliveira, phone: 55-13-35697120 and 35697148, FAX: 55-13-35697146. E-mail: mao@clp.unesp.br.

Abbreviations used: Prx, Peroxiredoxin; Trx, Thioredoxin; TrxR, Thioredoxin reductase; H₂O₂, hydrogen peroxide; Cys_P, peroxidatic cysteine; Cys_R, resolving cysteine; SOH, sulfenic acid; SO₂H, sulfinic acid; IMAC, immobilized metal-ion affinity chromatography; CHP, cumene hydroperoxide; LB, Luria-Bertani; IPTG, isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; DTT, dithiothreitol; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.

¹Departamento de Biologia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho Campus do Litoral Paulista São Vicente, Brazil, 11330-900.

Abstract

Eukaryotic typical 2-Cys peroxiredoxins (Prx) are very abundant antioxidant enzymes, representing up to 1% of the soluble protein content in the cell. These enzymes play important roles decomposing hydrogen peroxide, organic hydroperoxides and peroxinitrate conferring protective roles to the cells against oxidative damage. To decompose the hydroperoxides the typical 2-Cys Prx uses a cysteine residue, named peroxidatic cysteine (Cys_P) and after peroxide reduction, the Cys_P is oxidized to a sulfenic acid ($\text{Cys}_P\text{-SOH}$), which condenses with a second Cys residue, named resolving cysteine (Cys_R), to form a disulfide, which is frequently reduced by thioredoxin (Trx). When the cells are challenge with high levels of hydrogen peroxide, the Prx C_P may undergo overoxidation to sulfinic to sulfonic acids intermediates ($\text{Cys}_P\text{-SO}_2\text{H}$ and $\text{Cys}_P\text{-SO}_3\text{H}$, respectively) in a process mediated by thioredoxin (Trx). Overoxidation of 2-Cys Prx by hydrogen peroxide leads to loss of peroxidatic activity and is very well documented to eukaryotic organisms. However, the susceptibility of cysteine to overoxidation by organic hydroperoxides is poorly described and consequently any possible implication in which this mechanism is involved has remained unknown. However, in bacteria, for the typical 2-Cys counterparts named AhpC (alkyl hydroperoxide reductase subunit C), the roles and importance on organic hydroperoxides detoxification are well documented. In this work we investigated *Saccharomyces cerevisiae* Tsa1 and Tsa2 differences with relation of reactivate, overoxidation and high molecular weight formation. Kinetics dates reveled of Tsa1 there are high reactivate with H_2O_2 and CHP, however when CHP were used occur high inhibition of the reaction. Overoxidation assay demonstrate that the inhibition occur because CHP promote this process more efficiently than H_2O_2 in Trx-dependent peroxidase assay. Furthermore, biochemical observations associated with structural analyses of several eukaryotic 2-Cys Prx in reduced form, revealed the existence of extensive hydrophobic patches nearby to the active site pocket containing the peroxidatic cysteine suggesting that cyclic organic hydroperoxides may be relevant to oxidation of C_P in $C_P\text{-SO}_2\text{H}$. Since, Prx overoxidation may provide reduced Trx to participate in biological processes involving cell arrest and apoptosis and the fact that cyclic hydroperoxides are products of polyunsaturated fatty acids oxidation and are associated with the same processes, the Prx overoxidation by those agents may play an important role in cell signaling and homeostasis.